

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Composición química, actividad antioxidante *in vitro* y
evaluación cicatrizante *in vivo* del extracto metanólico
de corteza de *brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric
sanango”**

TESIS

Para optar al Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Norma Julia Ramos Cevallos

ASESOR

Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre

CO-ASESOR

Dr. Américo Jorge Castro Luna

Lima – Perú

2012

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

RESUMO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	2
III. PARTE EXPERIMENTAL	10
3.1. Materiales y métodos	10
3.1.1. Tipo de investigación	10
3.1.2. Materiales, reactivos y equipos.	10
3.1.3. Material biológico	10
3.1.4. Colecta del material vegetal	11
3.2. Obtención del extracto metanólico	11
3.3. Obtención y extracción de la manteca de cerdo	13
3.4. Test de sensibilidad e irritación	14
3.5. Análisis estructural por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (CG/EM)	14
3.6. Determinación de la actividad antioxidante: Método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)	15
3.7. Actividad cicatrizante del extracto metanólico de la corteza de <i>Brunfelsia grandiflora</i> D. Don	16
IV. RESULTADOS	18
4.1. Rendimiento del extracto metanólico de la corteza de <i>Brunfelsia grandiflora</i> D. Don “Chiric sanango”	18
4.2. Análisis cromatográfico	19
4.3. Obtención, purificación y análisis de la manteca de cerdo	19
4.4. Composición química del extracto	19
4.5. Elucidación de los componentes químicos	21
4.6. Determinación de la actividad antioxidante	26
4.7. Evaluación de la actividad cicatrizante	26

4.8.	Resultado del test de sensibilidad e irritación	26
4.9.	Análisis estadístico	29
4.10.	Estudio histopatológico del test de cicatrización	35
V.	DISCUSIÓN	38
VI.	CONCLUSIONES	43
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
VIII.	ANEXOS	50

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a todos los investigadores que silenciosamente trabajan para mejorar la calidad de vida de las poblaciones menos favorecidas.

A mis amados Padres: Germán y Julia por su amor y ejemplo de vida que me llevan a plasmar el anhelo de verme realizada como profesional.

A mis hijos: Jorge y William por su inmenso amor.

A mi amado esposo, por ser fuerte y perseverante en el cumplimiento de nuestras metas trazadas, digno ejemplo de padre y amigo.

A mis queridos hermanos: Hugo, Gledy, Patricia, Elena y Emma que con su cariño y respeto me fortalecen.

A mis sobrinos: Gabriela Patricia, Ricardo, César, Claudia, a mi primera nieta Berenice Sofía.

A las nuevas integrantes de la familia: Karen Amanda Cristina y Andrea Carolina.

Al Maestro Guía y ejemplo Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre, Asesor del presente trabajo de investigación, por su paciencia y dedicación a la enseñanza universitaria, por su caballerosidad y sencillez.

Al Co asesor de esta tesis Dr. Américo Jorge Castro Luna, por sus enseñanzas de Química, Recursos Naturales y Bromatología, por su paciencia y dedicación a la investigación.

A mi Alma Mater Universidad Nacional Mayor de San Marcos y la grandiosa e histórica Facultad de Farmacia y Bioquímica, a sus Docentes, Estudiantes, Personal Administrativo y de Servicio.

AGRADECIMIENTOS

AL HONORABLE JURADO EXAMINADOR DE SUSTENTACIÓN:

<i>Dr. Fernando Gilbert Quevedo Ganoza</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dra. María Elizabeth Gonzales Loayza</i>	<i>Miembro</i>
<i>Dr. José Ernesto Ráez González</i>	<i>Miembro</i>
<i>Dr. Julio Pedro López Castillo</i>	<i>Miembro</i>
<i>Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre</i>	<i>Miembro</i>

Al equipo multidisciplinario científico que con su ayuda hicieron posible la realización de la presente Tesis Doctoral:

- Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*
- Laboratorio de Toxicología de la Morgue Central de Lima.*
- Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón”, de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*
- Laboratorio de Farmacotecnia y Administración Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*
- Museo de Historia Natural “Javier Prado” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*
- Instituto de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con sede en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza.*

RESUMEN

El presente estudio fue diseñado con el objetivo de analizar la composición química del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango” y determinar su actividad antioxidante *in vitro* y cicatrizante *in vivo*. El extracto metanólico se obtuvo por maceración de un kilogramo de corteza con metanol; realizándose, sobre éste, reacciones químicas preliminares para la caracterización de sus constituyentes químicos por marcha fitoquímica y posterior identificación y elucidación por análisis cualitativo de Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM); detectándose la presencia de alcaloides de núcleo indólico: Ibogamina, estrictamina, secoaspidodasycarpina, pseudokopsinina, voacangina, hidroxindolenina, ibogaina, voaluteina, voacangina, vincoridina y akuammidina. La determinación de la actividad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico se realizó por el método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), no demostrando capacidad antioxidante. La investigación farmacológica para evaluar la actividad cicatrizante se hizo a través del diseño de pomadas en concentraciones de 1, 2, y 3 g % del extracto, vehiculizadas en una pomada a base de manteca de cerdo. Se trabajó con un grupo control y un grupo intervención, teniendo como patrón cicatrizante el ungüento comercial Clorelace®. Se emplearon 36 ratones albinos adultos machos de la especie *Mus musculus*, cepa *Balb C*53 de peso promedio 35 gramos, separados en seis grupos de seis ratones cada uno. Practicadas las incisiones en el tercio anterior dorsal del lomo, la cicatrización se evaluó utilizando el método tensiométrico de Howes *et al*, encontrándose una resistencia de tensión media de 137 mL de agua y una eficacia de cicatrización de 59,4 % con la pomada al 3 % del extracto, además de mejor evolución histológica en el proceso de cicatrización. La efectividad del patrón farmacológico Clorelace®, muestra alta significancia estadística en comparación con las otras concentraciones. Se concluye que este desempeño es debido a los componentes químicos de naturaleza alcaloide indólica del extracto metanólico.

Palabras clave: *Brunfelsia grandiflora* D. Don, “chiric sanango”, antioxidante, cicatrizante, alcaloide indólico, tensiométrico, histopatológico.

SUMMARY

The present study was designed to study the chemical composition of extract metanólico obtained from the bark of *Brunfelsia grandiflora* D. Don "chiric sanango", and determine its *in vitro* antioxidant activity and its healing activity *in vivo*. The methanolic extract obtained treating a kilogram of bark by maceration in methanol, and performing on it preliminary reactions of characterization of its chemical constituents by Phytochemistry march and subsequent identification and elucidation by qualitative analysis of gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS), highlighting the presence of alkaloids of indolic kernel: Ibogamina, estriactamina, secoaspidodasycarpina, pseudokopsinina, voacangine, hidroxyindoleninaibogaine, voalutenina, voacangine, vincoridina and akuanmidina. Determination of *in vitro* antioxidant activity of the methanolic extract was made using the method of capture of radical 2, 2-difenilpicrilhidrazil (DPPH); do not showing antioxidant capacity. The pharmacological research to evaluate the healing, activity of extract metanólico from the bark of *Brunfelsia grandiflora* D. Don. Was through the design of ointments in concentrations of 1, 2, and 3% of the extract, conveyed with lard as a basis in its formulation commercial ointment Clorelace®. Were employed a control group and an intervention group, using as healing pattern a commercial ointment. The biological material used consisted of 36 Adult male albino mice strain Bald C53 with average weight of 35 grams; which were split into six groups of six mice each. Were practiced incisions in the previous third dorsal of the loin of mice, and healing activity was assessed using the tensiometric method of Howes *et al*. The performed experiment corroborated the healing activity atributted to the bark *Brunfelsia grandiflora* D. Don, showing a tension resistance average of 137 mL of water and healing effectiveness of 59.4%, in the ointment concentrated 3 % of extract, which also showed the best histological evolution on healing process. Statistical analysis shows that the pharmacological pattern; Register greater resistance of the voltage and high significance than the rest of treatment. This activity would be attributed to the chemical components of indolic alkaloid nature which has metanólico of its bark extract.

Keywords: *Brunfelsia grandiflora* D. Don, "Chiric sanango", bark, antioxidant, healing, indole alkaloid, tensiometer, histopathology.

RESUMO

Deste estudo foi concebido com o objectivo de analisar a composição química do extrato metanólico de casca de *Brunfelsia grandiflora* d. Don "chiric sanango" e determinar sua atividade antioxidante in vitro e in vivo cura atividade. O extracto de metanólico foi obtido por maceração de um quilograma de casca com metanol efectuado sobre ele reacções preliminares de caracterização dos seus constituintes químicos por fitoquímica Março e posterior identificação e elucidação por análise qualitativa de cromatografia em fase gasosa / espectrometria (GC/MS); de massa destacando a presença de alcalóides no kernel indólico: Ibogamina, strictamina, secoaspidodasycarpina, pseudokopsinina, hidroxyindolenina, ibogaine, voaluteina, voacangine, voacangine, vincoridina e akuammidina. A determinação da atividade antioxidante in vitro do extrato de metanólico feito pelo método de captura de radical 2, 2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), não demonstrando capacidade antioxidante. Droga de investigação para avaliar a atividade de cura foi feita através do projeto de pomadas em concentrações de vehiculizadas 1, 2 e 3 g % extrato, com banha como base. Trabalhou com um controle de grupo e um grupo de intervenção, tendo como uma pomada comercial padrão cicatrizant Clorelace ®. Usado 36 ratos albino machos adultos da espécie, *Mus musculus*, estirpe Balb C53 de peso 35 gramas, divididas em seis grupos de seis ratos cada em média. Praticado incisões na anterior terceiro dorsal do lombo, cura foi avaliada usando o método tensiométrico de *Howes et al*, encontrar resistência de tensão média de 137 mL de água e uma eficácia da cura de 59,4% pomada 3% de extrato, bem como melhor histológica evolução no processo de cura, trabalhou com um controle de grupo e um grupo de intervenção, tendo como uma pomada comercial padrão cicatrizant Clorelace ®. mostra alta significância estatística em comparação com outras concentrações. Concluimos que este desempenho é devido aos ingredientes químicos de natureza alcalóide extracto metanólico indólica.

Palavras-chave: *Brunfelsia grandiflora* d. Don, "chiric sanango", antioxidante, cura, indólico, tensiométrico, alcalóide histopatológico.

I. INTRODUCCIÓN

Hay etnias que tienen conocimientos muy profundos sobre las propiedades medicinales y curativas de plantas que podrían servir de modelo en las síntesis de nuevos fármacos.

La colección de estas plantas, así como los estudios y trabajos para la determinación taxonómica, fitoquímica, farmacológica y toxicológica de estas especies, aportarían extraordinarios conocimientos relacionados a la cicatrización de lesiones de la piel, incluyendo la leishmaniasis cutánea que forma úlceras generalmente en la cara, tronco, brazos y piernas. *Brunfelsia grandiflora* D. Don, conocida comúnmente, entre otros nombres, como “chiric sanango”, es una planta nativa de la selva amazónica del Perú.

Los nativos le atribuyen efecto terapéutico de acción cicatrizante y la utilizan exclusivamente para el tratamiento de la “leishmaniasis tegumentaria”, mediante la aplicación del extracto acuoso de la corteza en la zona afectada durante varios días. También es utilizada como planta ornamental. Se tiene escasa información sobre su composición química, reportándose sólo la presencia de escopoletín, ácido láctico, ácido tartárico y ácido quínico.

Conociendo que el efecto cicatrizante es atribuido al extracto de la corteza, se optó por realizar el estudio fitoquímico y la elucidación de sus estructuras; así como, determinar la actividad antioxidante *in vitro* empleando el método del DPPH y la acción cicatrizante *in vivo* en ratones albinos machos de la especie *Mus musculus* de cepa *Balb C53*, la cual se evaluó con el modelo tensiométrico de Howes *et al* y el método de Vaisberg y col., utilizando pomadas preparadas con el extracto metanólico de la corteza en concentraciones de 1, 2 y 3 g %, a base de manteca de cerdo, y el ungüento comercial Clorelace® como patrón cicatrizante de comparación.

El motivo para el estudio de esta especie nativa, radica en su uso en la medicina tradicional por el efecto cicatrizante, atribuido al extracto acuoso de su corteza, no habiéndose encontrado estudios al respecto. Es así que se hace importante profundizar en el conocimiento sobre la composición química de sus principios activos, su actividad antioxidante y corroborar el efecto cicatrizante de dicho

extracto a través de un bioensayo farmacológico y estudio histopatológico. Por tal razón, en el presente estudio se señalan como objetivos determinar la composición química, y evaluar actividad antioxidante *in vitro* y el efecto cicatrizante *in vivo* del extracto metanólico de la corteza.

II. GENERALIDADES

La tendencia de integrar los conocimientos de la medicina tradicional con la medicina científica, sustentada en la experiencia y la observación, hace posible la validación de la acción terapéutica y el establecimiento de los usos correctos de los recursos vegetales.

Esta planta de uso tradicional perteneciente a la familia Solanaceae, género *Brunfelsia* y especie *Brunfelsia glandiflora* D. Don, conocida en la sinonimia vulgar como: Chiric sanango, chiricaspi piaedo, borrachero, chi-pi-ri-tsonturba-ka (kofán); chiricaspi chacrudo (quechua); hu-ha-hai, sanango, mucapari (Shipibo-conibo); yai-hu-ha-hai (Siona); huayrapanga, chirihuayusa. Es un arbusto glabro que presenta hasta cinco metros de altura, de corteza muy dura, hojas alternas, apicalmente frondosas o dispersas en las ramas en floración, de 15 a 20 cm de largo, de 5 a 8 cm de ancho. Posee Inflorescencia cimosa, flores pediceladas de 3,5 a 4 cm de longitud, de color morado y blanco con corola tubular, campanulada con 5 grandes lóbulos, cáliz corto de 1,5 a 2 cm de longitud, anteras libres del estigma, pequeñas, obtusas, apendiculares en la base, ovario superior bicarpelar. Fruto en baya, ovada-redondeada¹.

Crece en Sudamérica desde Venezuela hasta Bolivia. En el Perú se distribuye en la selva amazónica hasta una altitud de 200 metros, en los departamentos de Loreto, San Martín y Cusco, comprendiendo a la Amazonía baja y alta². En la Amazonía peruana, la maceración acuosa de la raíz de *Brunfelsia glandiflora* D. Don es utilizada como bebida contra artritis, sífilis y como antifebrífugo. La toma de la decocción de sus hojas se usa contra la artritis y reumatismo. El cocimiento concentrado de la corteza se aplica en quemaduras y en zonas corporales afectadas por leishmaniosis o uta^{3,4}. Esta especie también es empleada como aditivo para preparar “ayahuasca”, entre los jíbaros y kofanes, y se sospecha que lo usan por su poderoso efecto narcótico⁵⁻⁷. Los nativos y pobladores de la sierra y selva del Perú lo utilizan para el tratamiento de la leishmaniasis y cicatrización de heridas, así chiric sanango *Brunfelsia glandiflora* D. Don se usa contra la uta aplicando el cocimiento concentrado de la corteza en la parte afectada⁸.

Siendo tan importante el estudio de esta especie botánica nos interesó la información sobre su composición química, que es muy escasa, reportándose

solo la presencia de: escopoletín, ácido láctico, ácido tartárico y ácido quínico². Se han relacionado con su actividad leishmanicida, al mencionado escopoletín, además de ácido ursólico y ácido clorogénico⁹⁻¹¹. Asimismo, se ha realizado en esta especie trabajos de investigación en busca de nuevas alternativas para el tratamiento de la malaria, con el extracto acuoso, etanólico y diclorometánico de *Brunfelsia grandiflora* por su acción antiparasitaria¹². El compuesto aislado presenta potente actividad leishmanicida *in vitro* contra *Leishmania major*. La estructura de la saponina fue determinada por análisis espectroscópico y reacciones químicas. La especie fue colectada en la selva del Perú e identificada en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP)¹³.

El grupo más grande de metabolitos secundarios de las plantas son alcaloides, aislados de semillas, raíces, cortezas, hojas, que se hallan principalmente en las familias apocynaceae, solanaceae, papaveraceae, rutaceae, ranunculaceae y rubiaceae, encontrarse al estado libre, como glicósidos o formando sales de ácidos orgánicos. Son biosintetizados generalmente a partir de aminoácidos o por vía pseudoalcaloide, poseen un nitrógeno heterocíclico procedente de aminoácidos. Los métodos de extracción son muy variados, encontrándose, entre estos, el de fluidos supercríticos con dióxido de carbono. Se clasifican de acuerdo a la similitud de las estructuras moleculares en: indólicos, imidazólicos, morfínicos, pirrolidínicos, piridínicos y piperidínicos, isoquinoleínicos y feniletilamínicos, quinolínicos, quinolizidínicos, esteroidales y diterpénicos. Estos alcaloides de núcleo indólico, poseen en su estructura el núcleo indol más o menos modificado. La biogénesis de dichos compuestos ha encontrado una adecuada interpretación, lo cual ha llevado a la síntesis completa de alcaloides de estructura tan compleja como la estricnina.

Muchos alcaloides son conocidos como derivados del indol; sin embargo, las estructuras seguras o casi seguras han sido identificadas, aún para alcaloides tan conocidos como la yohimbina, estricnina, brucina y tebaína. A este grupo se han ido incorporando nuevos alcaloides del grupo del indol como: ajmalina, serpentina, corinanteina, sempervirina, etc. Un interesante grupo de alcaloides con grupo indólico es el de los alcaloides presentes en las semillas de *Pirralima nítida*, Stapf: akuammina, akuammicina, akuamminina, akuammilina, akuammidina, akuammigina y pseudoakuammidina¹⁴. Teniendo el conocimiento

de la importancia de la presencia de los alcaloides responsables de las propiedades farmacológicas se determinó la presente investigación, afín de profundizar y comprobar su acción benéfica.

Asimismo, es pertinente considerar como parte del estudio a los antioxidantes, que son sustancias que inhiben la tasa de oxidación de los nocivos radicales libres, causantes de la disminución de defensas y daño celular con posibilidad de producir cáncer, aterosclerosis y envejecimiento. Los antioxidantes neutralizan y cumplen su función, sin perder su estabilidad electroquímica; actúan donando electrones para evitar que los radicales libres los capten de las células. Son utilizados en alimentos y previenen o inhiben el desarrollo de la rancidez o la aparición de compuestos de deterioro por oxidación. Ciertos componentes químicos como vitaminas, minerales y enzimas actúan como antioxidantes protegiendo nuestro organismo de la formación de radicales libres. Los antioxidantes celulares de naturaleza enzimática mejor estudiados son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH) y metionina reductasa, los cuales pueden ser suplementados por una dieta rica en antioxidantes como las vitaminas A, E y C, selenio y zinc, entre otros nutrientes. Entre los antioxidantes naturales encontrados en las plantas, tenemos a los flavonoides, derivados del ácido cinámico, tocoferoles y ácidos orgánicos polifuncionales¹⁵⁻¹⁷.

El consumo de carotenoides está relacionado con la prevención de cataratas, aterosclerosis, degeneración muscular y esclerosis simple así como, a una baja incidencia de cáncer de próstata¹⁸. Asimismo, la ingesta de licopeno, β -caroteno y compuestos polifenólicos; entre los que destacan los flavonoides, antraquinonas, cromonas, cumarinas y otros constituyen un importante grupo de antioxidantes naturales^{19,20}. Entre los antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimentaria, que estabilizan y protegen grasas vegetales y animales, tenemos al Butil hidroxitolueno (BHT), Butil hidroxianisol (BHA), terbutil hidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (PG)²¹.

La piel es el órgano que regula el balance de los líquidos y electrolitos, modula los cambios de temperatura corporal, contribuye a mantener el volumen vascular

sanguíneo y sus demandas de emergencia; posee un delicado sistema que la relaciona con el medio ambiente y es asiento de muchas reacciones bioquímicas que le confieren el carácter de órgano en constante estado de actividad. Consta de tres capas: epidermis, dermis e hipodermis²².

La cicatrización de heridas es un proceso de regeneración en la continuidad de la piel, que comienza con la hemostasia, abarcando posteriormente la respuesta inflamatoria, la formación de tejido conectivo, el recubrimiento de la lesión con epitelio y al final la remodelación de la herida, dando como resultado la formación de una cicatriz. Los sucesos que aquí intervienen dependen del tipo de herida, su extensión, la naturaleza del agente vulnerante y el grado de contaminación bacteriana²³. En heridas cutáneas se conocen dos tipos de cicatrización:

Cicatrización por primera intención, cuando se trata de una herida pequeña y se produce por una herida quirúrgica, en la que hay cambios en la permeabilidad capilar y flujo de sangre, que lleva a la adherencia de leucocitos a la pared capilar y hacia el espacio extravascular del área dañada. La cicatriz incluye tejido conectivo celular cubierto por una epidermis normal. Los apéndices y anexos dérmicos destruidos nunca regeneran²⁴.

Cicatrización por segunda intención, cuando los defectos extensos tienen mayor volumen y la reacción inflamatoria es más intensa. La contracción de la herida depende de la movilidad de la piel y, ante una mayor movilidad ocurrirá mayor contracción de tejido de granulación normal con presencia de miofibroblastos^{25,26}. En ambos tipos de cicatrización se aprecia inicialmente la formación de un coágulo, el cual sufre deshidratación, dando lugar a una costra que tiene como función aislar, de las agresiones ambientales, físicas y biológicas, a los tejidos vivos y sanos de epidermis, y dermis que rodean a la lesión.

La epitelización se produce cuando migran los queratinocitos y a continuación se dividen para recubrir la pérdida de espesor parcial de piel o mucosa. La contracción se da cuando hay un cierre espontáneo de heridas cutáneas de espesor total o constricción de órganos tubulares, como el colédoco o el esófago, después de una lesión, y el último mecanismo es el depósito de matriz de tejido

conjuntivo que comprende la incorporación de fibroblastos hacia el sitio de la lesión y producción de una matriz de tejido conjuntivo, Este proceso es muy importante en el cierre primario de heridas, sean de piel, tendones o anastomosis intestinal. El colágeno transversal y su organización en el tejido conjuntivo que se forma en el proceso proporcionan la fuerza e integridad a todos los tejidos^{27,28}.

Las afecciones dermatológicas se caracterizan por presentar alteraciones en la estructura y funcionabilidad de la piel. Dichos procesos pueden ser de muy diversa etiología, sintomatología y tipos; precisando independientemente, muy a menudo, de una medicación por vía sistémica. Con este tipo de preparados se busca casi exclusivamente, efectos localizados en piel (epidermis o dermis) o mucosas, donde debe evitarse o reducir al máximo la absorción transcutánea de componentes o de productos activos presentes en los mismos, que puedan provocar efectos secundarios no deseados. Existen una serie de factores, tanto desde el aspecto dermatológico como del preparado farmacéutico, a considerar en el momento de prescribir o diseñar un medicamento de aplicación tópica: Elección del principio activo adecuado. Elección de la forma farmacéutica y excipientes idóneos. Consideración de los efectos dermatológicos y cosméticos del vehículo. Tan solo configurando adecuadamente las tres premisas anteriores, suponiendo que el medicamento esté correctamente aplicado, podrá obtenerse el éxito terapéutico del mismo.

La farmacoterapia dermatológica es muy amplia e incluye, entre otros principios activos, a: cicatrizantes, germicidas, antiinflamatorios, astringentes, queratolíticos, emolientes, antipruriginosos, etc. Estos deben presentar una alta especificidad, ya que por ejemplo, numerosas afecciones fúngicas no se resuelven mediante la aplicación de pomadas antibióticas de acción local, infecciones bacterianas que requiriéndose en cada caso fármacos de acción mucho más específica. Debe asimismo, recordarse que en piel descarnada o lesionada con pérdida de estratos epidérmicos superiores, como ocurre en incisiones, la absorción de principios activos puede estar notablemente incrementada, con el riesgo subsiguiente de que puedan generar efectos sistémicos no deseados.

La Farmacopea Europea define a las pomadas como preparaciones de consistencia semisólida destinadas a ser aplicadas sobre la piel o sobre ciertas

mucosas, con el fin de ejercer una acción local, o dar lugar a la penetración percutánea de medicamentos, o por su acción emoliente o protectora. Añade así mismo que deberían tener un aspecto externo homogéneo, estar constituidas por un excipiente simple o compuesto, en el cual se disuelvan o dispersen uno o más principios activos. En relación a los excipientes integrales de las pomadas indica que pueden ser sustancias de origen natural o sintético y estar constituidos por un sistema de una o varias fases y que, de acuerdo con la naturaleza del excipiente, la pomada pueda tener propiedades hidrofílicas. Se indica que dichas formas galénicas pueden contener además agentes antioxidantes, antimicrobianos, anticicatrizantes, estabilizantes, emulgentes y espesantes; asimismo, precisa la necesidad de esterilidad cuando están destinadas a ser aplicadas en heridas abiertas y piel gravemente dañada.

La literatura galénica, establece que todas aquellas fórmulas de uso externo a base de grasas, naturales o sintéticas, reciban denominación de “pomadas”. En su preparación se utiliza mantequilla, manteca de vaca o de cerdo, aceites o grasas vegetales, aceite de oliva, almendra, maní y otros similares²⁹⁻³¹, el cerdo, *Sus scrofa domestica*, es un mamífero usado en la alimentación humana y es fuente primaria de grasa comestible³², el “Cold cream” diseñado por Galeno, inicialmente fue elaborado a base de esta grasa con la adición de cera de abejas; la cual, Cleopatra, hacía preparar con la adición de otros ingredientes³³. Algunos autores mencionan que la mejor grasa utilizada para la elaboración de pomadas es la del pollo, seguida de la del cerdo y luego de la vaca, empleándose también la parafina o vaselina. La manteca de cerdo fue utilizada desde la antigüedad, no sólo como alimento, sino también con fines medicinales y cosméticos. En su composición contiene ácidos grasos saturados e insaturados capaces de ser saponificados, siendo los principales el palmítico y esteárico. Debido a su composición es útil en la fabricación de jabones y preferible a las grasas vegetales^{34,35}.

De manera general, la manteca de cerdo es la porción grasa obtenida exclusivamente del tejido adiposo acumulado en las zonas del tórax y abdomen del cerdo, obteniéndosela por proceso en seco o húmedo en autoclave. El

principal inconveniente es su enranciamiento por exposición prolongada al aire, debido a que se oxida fácilmente ya que carece de antioxidantes naturales^{36,37}.

Para los trabajos de investigación en animales de experimentación se promoverá una reflexión consciente sobre el uso y cuidado de ellos, articulando conceptos técnicos, éticos, de calidad, validez y competitividad científica. Tradicionalmente a los animales no se les reconoce estatus moral por lo que no tienen injerencia en las decisiones que los otros seres toman en relación a ellos; mientras que en la ética occidental tradicional, con todas los argumentos previos, han estimado como neutral en sí, unir la relación del hombre con el resto de especies animales, considerando lo siguiente:

- Brindar los cuidados a los animales según la etología.
- Evitar el dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas.
- Evitar la duplicación o repetición innecesaria de experimentos.
- Reducir al mínimo indispensable el número de animales para garantizar la validez del estudio a realizar^{38,39}.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Tipo de investigación

Experimental, analítica, prospectiva y longitudinal.

3.1.2. Materiales, reactivos y equipos

a. Reactivos y materias primas

2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)(Sigma Chemical Company)

Metanol grado analítico (Merck Darmstadt)

Ketamina inyectable 500mg/10mL (Laboratorio Sanderson S.A.)

Trolox (Acido-6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)
(97%) (Aldrich- Chemical Co)

Cera de abejas

Crema depiladora

Aceite de sésamo

Manteca de cerdo

Ungüento Clorelase®

Formaldehído 36,5%(FLUKA Chemical).

b. Equipos

Cromatógrafo de Gases/Espectrómetro de Masas (CG/EM).

Modelo CG: Trace/EM: Trace.

Sistema DIVAC 0,6L para filtración al vacío

Dinamómetro (equipo de tensión con agua)

Lámpara UV 254 nm

Sistema BUCHI Heating Bath B-490 (Rotavapor)

Espectrofotómetro Labomed Inc. UV-VIS Double Beam PC and scanning autocell.

Homogeneizador Vortex Mixer. VM 300

Microscopio ZEISS CP-ACHROMT-ICS-KFZ

Equipo de disección.

3.1.3. Material biológico

Ratones albinos consanguíneos machos de la especie *Mus musculus* de tres meses de edad, con un peso corporal promedio de 35 g, cepa

Balb C53 procedente del Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Productos Biológicos – Chorrillos.

3.1.4. Colecta del material vegetal

La corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don se colectó en el distrito de Contamana, provincia de Iquitos en el departamento de Loreto, a 200 m de altitud, en el mes de mayo del 2010. La especie completa en su estado de floración fue seleccionada para su posterior clasificación taxonómica en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Anexo 1.

3.2. Obtención del extracto metanólico

Se empleó 1 kg de corteza, sometida a proceso de trozado y posterior maceración en 2 L de metanol, en frasco color ámbar con agitación diaria durante siete días, posteriormente se realizó un proceso de doble extracción y, el filtrado obtenido, se evaporó a sequedad en rotavapor hasta obtener el extracto seco.

a. Ensayo de solubilidad y marcha fitoquímica

La solubilidad del extracto metanólico se evaluó utilizando solventes de polaridad creciente. La marcha fitoquímica del extracto se realizó a través de reacciones químicas de coloración y precipitación.

b. Análisis cromatográfico

Se realizó en cromatoplasacas de 20 x 20 cm, con 2 mm de espesor de silicagel GF 254 η m, utilizándose como fase móvil Ácido acético/ metanol/ acetato de etilo/ cloroformo (0,5/ 2/ 2/ 6) y agentes reveladores para grupos funcionales⁴⁰.

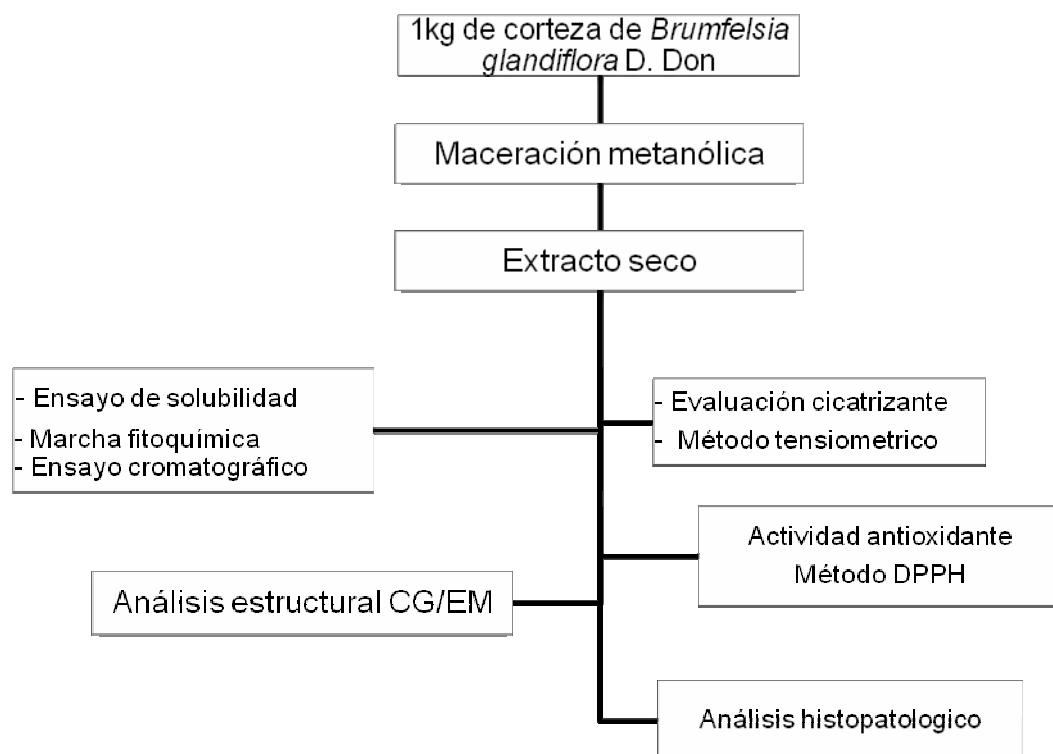


Figura 1. Diagrama de flujo del trabajo experimental

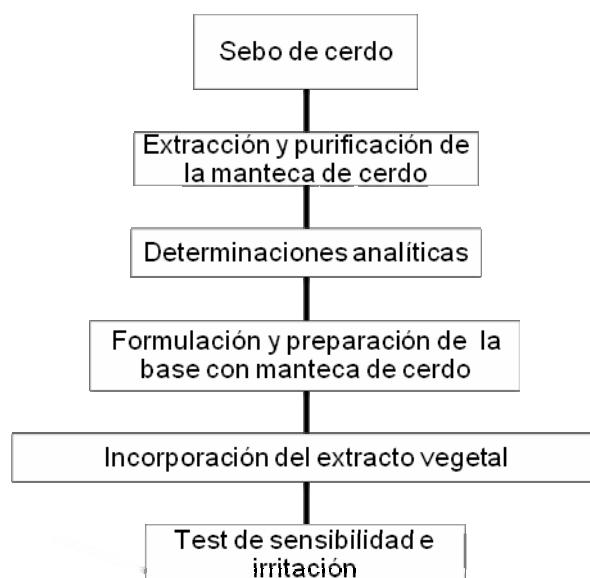


Figura 2. Diagrama experimental para el diseño y formulación de las pomadas

3.3. Obtención y extracción de la manteca de cerdo

A un kilogramo de abdomen de cerdo, adquirido en el mercado Municipal “Gran Mariscal Ramón Castilla” de la Municipalidad Metropolitana de Lima, se le retiraron restos de piel, carne y tejido sanguíneo, luego se lavó con agua destilada. La técnica utilizada en el proceso de extracción de la manteca fue el calentamiento en medio acuoso; para ello se colocaron 300 g de grasa en un vaso precipitado de 1 L y se adicionó agua destilada hasta cubrir la grasa; en seguida se sometió a calentamiento reponiendo el agua que se iba evaporando. Cada 150 mL se retira el agua que contiene la manteca fundida y se coloca en un vaso de precipitado para su enfriamiento. Al enfriarse la fase acuosa solidifica la manteca en la parte superior, la cual es retirada para su posterior proceso de purificación⁴⁵.

a. Purificación y análisis de la manteca de cerdo

En un vaso de precipitado de 500 mL se colocaron 100 g de manteca de cerdo y se adicionó 100 mL de cloroformo. Se agitó vigorosamente, añadiéndose 100 mL de agua destilada y se sometió a calentamiento a una temperatura de 40 – 50 °C. Se dejó en reposo para que se separe la fase acuosa de la fase orgánica. Esta última fue retirada a una cápsula de porcelana y se llevó a estufa a temperatura de 40 – 50 °C, para la eliminación del cloroformo.

Posteriormente se realizaron las determinaciones analíticas⁴¹.

b. Formulación y preparación de la base con manteca de cerdo

Se procedió al diseño y preparación de la base, siguiendo la recomendación seleccionada y utilizada para la elaboración de las pomadas, con un pH de 6,6, tuvo la siguiente composición:

- | | |
|------------------------------|------|
| ▪ Manteca de cerdo | 45,0 |
| ▪ Cera de abejas, purificada | 20,0 |
| ▪ Aceite de sésamo | 35,0 |

A esta base se le incorporó el extracto vegetal en concentraciones de 1, 2 y 3 g %; todas alcanzaron un pH cercano al de la base: 6,5.

3.4. Test de sensibilidad e irritabilidad

La base con los extractos vegetales incorporados, así como la base pura, se sometieron a prueba de tolerancia en voluntarios humanos, con consentimiento informado.

Para esto se seleccionaron 10 personas divididas en 5 grupos de 2 personas por grupo. Al primer grupo se le aplicó la base elaborada con manteca de cerdo. Al segundo se le aplicó manteca pura de cerdo y, al tercero, cuarto y quinto grupos la base con los extractos vegetales incorporados en concentraciones de 1, 2 y 3%, respectivamente. Extendidas las muestras sobre un área de la piel del antebrazo, se cubrió la zona con una lámina de polietileno transparente y se dejó por 24 horas para observar fenómenos de sensibilidad e irritación de la piel^{42, 43}.

3.5. Análisis estructural por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM)

La elucidación estructural de los componentes químicos del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango”, se realizó por un sistema de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) utilizando columna RESTEK RXI® - 5 y (Crossbond® 5 % diphenyl 95 % dimethyl polysiloxane) de 30 metros de largo por 0,25 mm de diámetro interno, 0,25µm de espesor de película. Se utilizó un equipo computarizado con un procesador de software en condición de muestra de 0,1% de extracto en metanol, con columna a temperatura de inyección de 120 °C por 1 minuto, elevándose la temperatura a 12 °C por minuto hasta 320 °C y manteniéndose a esa temperatura por 3,3 minutos.

El espectro de masa se obtuvo con un sistema computarizado constituido por un cromatógrafo modelo CG: TRACE acoplado a un detector selectivo de masa modelo EM: TRACE. El espectro de masa fue tomado sobre 35-400 m/z usando un voltaje de ionización de 70ev. La identificación de los componentes químicos se fundamenta en la comparación con estándares de espectros de masas de las respectivas bibliotecas (MAINLIB, PMWTOX3N, REPLIB)⁴⁴⁻⁴⁷.

3.6. Determinación de la actividad antioxidante: Método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)

a. Fundamento

El 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), es un radical libre estable que experimenta una reacción de reducción ante un antioxidante o un radical libre, ocasionando una disminución de su absorbancia.

El DPPH disuelto en metanol adquiere un color violeta y cuando reacciona con sustancias atraparoras de radicales libre donadoras de hidrógeno, se desarrolla un cambio del color violeta a amarillo o naranja pálido produciendo la desaparición del color a medida que disminuye la absorbancia a 515 nm. El mecanismo de reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de la sustancia donadora de hidrógeno, para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina y un radical libre. El resultado se expresa como IC₅₀ (concentración inhibitoria), porcentaje de inhibición, porcentaje de actividad antiradicalaria o equivalentes a trolox o a la vitamina C ^{48, 49}.

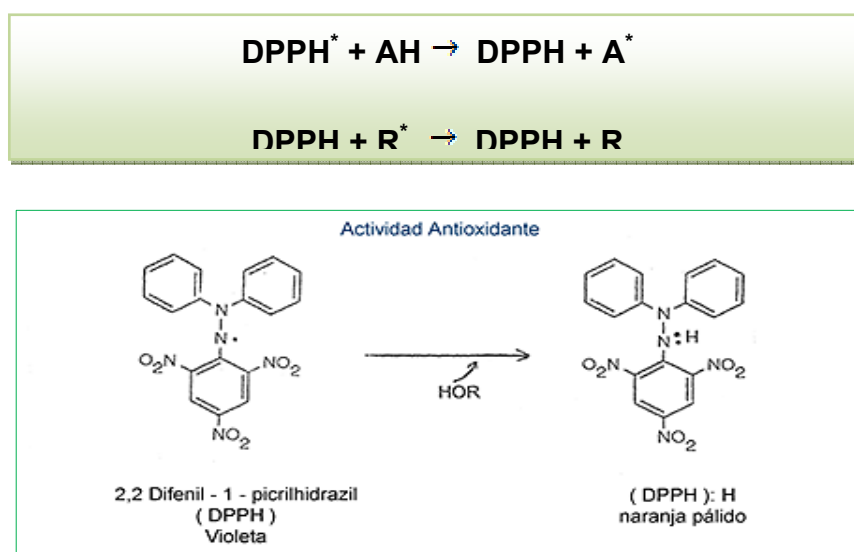


Figura 3. Reacción de reducción del DPPH

b. Procedimiento

La solución del DPPH, se preparó en metanol, usándose como estándar antioxidante una solución de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%), que es una sustancia sintética derivada de la vitamina E. Asimismo, se preparó un extracto stock de la muestra de 5,4 mg/mL en un

medio hidroalcohólico (1:1) a partir de esta solución se realizaron diluciones hasta 1,5 mg/mL que en el tubo de reacción equivale a 0,5 mg/mL.

c. Lectura de resultados

Las muestras se leyeron a longitud de onda de 517 nm en espectrofotómetro (Labomed Inc. UV. VIS Double Beam PC and scanning autocell). Los resultados se expresaron según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Donde:

A = Lectura del DPPH

B = Lectura del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don.

Se determinó el IC50 para el trolox y para el extracto metanólico de la corteza.

3.7. Actividad cicatrizante del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don

Técnica operatoria

Se utilizaron 36 ratones albinos consanguíneos machos de la especie *Mus musculus* cepa Balb C53, de tres meses de edad, con un peso corporal promedio de 35 g, procedentes del Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Productos Biológicos – Chorrillos. Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en seis grupos de seis animales cada uno.

Se les mantuvo en jaulas individuales, en ambientación con temperatura constante, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante una semana, para verificar su óptima condición de salud, siendo alimentados con alimento especial de dieta normocalórica, normoproteica y agua embotellada sin gas *ad libitum*.

Posteriormente fueron depilados en el tercio anterior dorsal del lomo, con una crema depilatoria corporal (crema VEET[®]) y separados en jaulas individuales previo peso, observando si había daños o irritación en la piel.

Después de 24 horas fueron anestesiados por vía intraperitoneal de acuerdo a sus pesos con ketamina a dosis promedio de 0,49 mg/Kg de peso corporal, para facilitar el tratamiento quirúrgico. Antes de la operación, se realizó la limpieza y desinfección de la piel y de los materiales del equipo de disección.

Se practicó una incisión de un centímetro de longitud, perpendicular al eje longitudinal del lomo depilado. Inmediatamente, se unieron los bordes de la herida con un punto de sutura de nudo triple.

La aplicación de las pomadas y el tratamiento de los grupos del bioensayo se realizaron cada 12 horas durante una semana. Los grupos experimentales fueron distribuidos de la siguiente manera:

- a. Seis ratones como grupo control con lesión y sin tratamiento.
- b. Seis ratones como grupo de aplicación de la base de manteca de cerdo.
- c. Seis ratones como grupo de referencia farmacológica o grupo patrón, al que se le aplicó el ungüento comercial Clorelace[®].
- d. Tres grupos de seis ratones cada uno, a los que se les aplicó por vía tópica las pomadas en concentraciones de 1, 2 y 3 g% del extracto metanólico de la corteza, respectivamente.

Al término del período experimental, los animales fueron sacrificados por inhalación de cloroformo. Se les retiró el punto de sutura y se le colocó en posición decúbito ventral sobre la mesa del equipo de tensión para proceder a medir la resistencia de la apertura de la herida en toda su extensión, a través de la fuerza de tensión necesaria generada por la medición en mililitros de agua destilada utilizados⁵⁰⁻⁵².

IV. RESULTADOS

4.1. Rendimiento del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “Chiric sanango”extracto

El proceso de maceración metanólica, dio un rendimiento de 4% p/p presentado aspecto semi-mucilaginoso, color marrón oscuro, sabor amargo, olor a vegetal desecado y de reacción ligeramente ácida.

La solubilidad del extracto frente a solventes orgánicos de polaridad creciente, así como la marcha fitoquímica y los resultados de coloración y precipitación para grupos funcionales se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Solubilidad del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don.

Extracto metanólico (mg)	Solvente (mL)	Resultado
100	Éter etílico	(-)
100	n-hexano	(-)
100	Cloroformo	(+++)
100	Acetato de etilo	(++)
100	Acetona	(++)
100	Metanol	(+++)
100	Etanol	(+++)

Simbología: soluble (+++), parcialmente soluble (++) , insoluble (-)

Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto metanólico *Brunfelsia grandiflora* D. Don

Reactivo	Metabolito secundario	Característica	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado rojo-naranja	(+++)
Mayer	Alcaloides	Precipitado blanco	(+++)
Sonneschein	Alcaloides	Precipitado amarillo-verdoso	(++)
Yodoplatinato	Alcaloides	Color azul-violáceo	(+++)
Lieberman-Bouchardat	Triterpenoides y esteroides	Sin coloración	(-)
Gelatina	Taninos	Sin precipitado blanco	(-)
Cloruro férrico	Fenoles	Sin coloración	(-)
Shinoda	Flavonoides	Sin coloración	(-)

Simbología: Abundante (+++), Moderado (++), Negativo (-)

4.2. Análisis cromatográfico

El fraccionamiento del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don, obtenido en el cromatograma y sus correspondientes Rf se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Rf de alcaloides indólicos del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don.

Mancha	Rf	Luz UV ₂₅₄ nm	Reactivo Dragendorff
1	0,94	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
2	0,92	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
3	0,86	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
4	0,73	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
5	0,70	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
6	0,66	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
7	0,54	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
8	0,37	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
9	0,31	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja
10	0,22	Fluorescencia amarilla	Precipitado rojo-naranja

4.3. Obtención, purificación y análisis de la manteca de cerdo

De la grasa del abdomen del cerdo se obtuvo un rendimiento de 90% de manteca que fue purificada con cloroformo, expresando las siguientes determinaciones analíticas:

- Presencia de colesterol
- Punto de fusión de 30-32 °C
- Punto de solidificación de 10 °C
- pH: 6,6
- Densidad 0,81

4.4. Composición química del extracto

Los resultados del análisis de la composición química del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “Chiric sanango”,

por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM). Se muestran en la figura 4 y tabla 4.

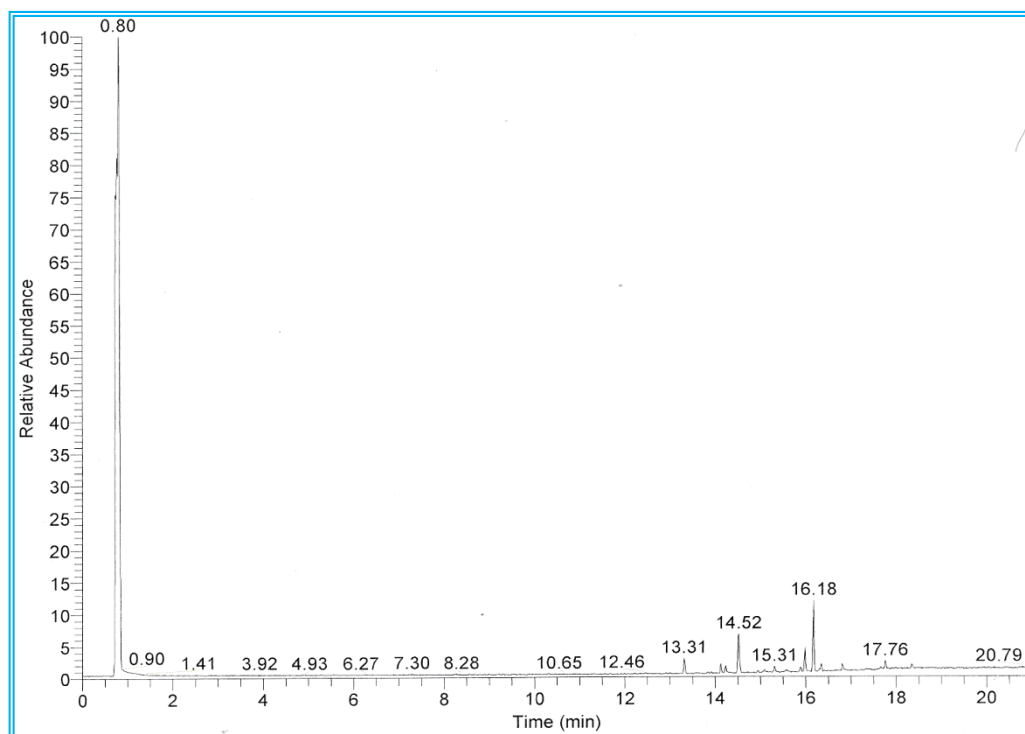


Figura 4. Cromatografía de Gas del extracto metanólico de la corteza *Brunfelsia grandiflora* D. Don

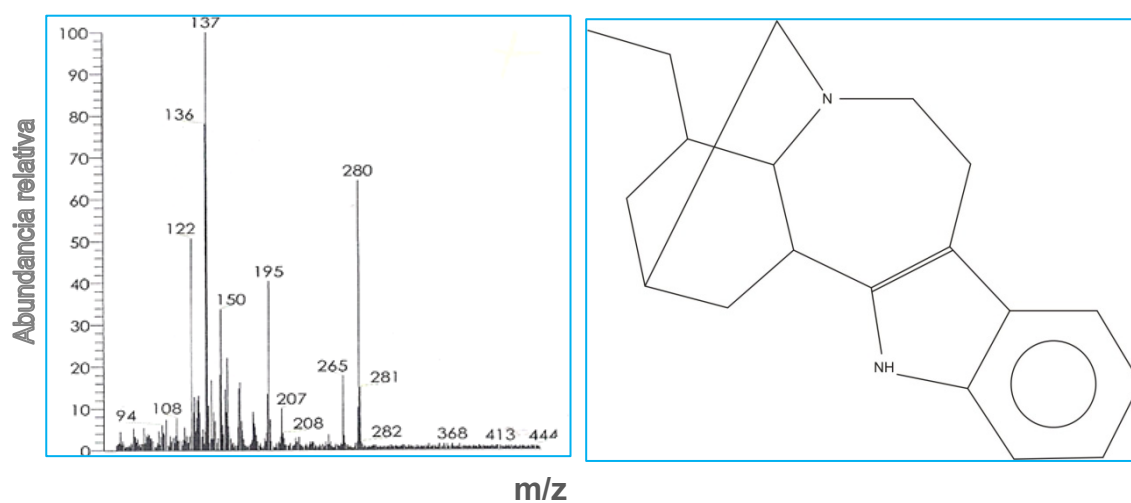
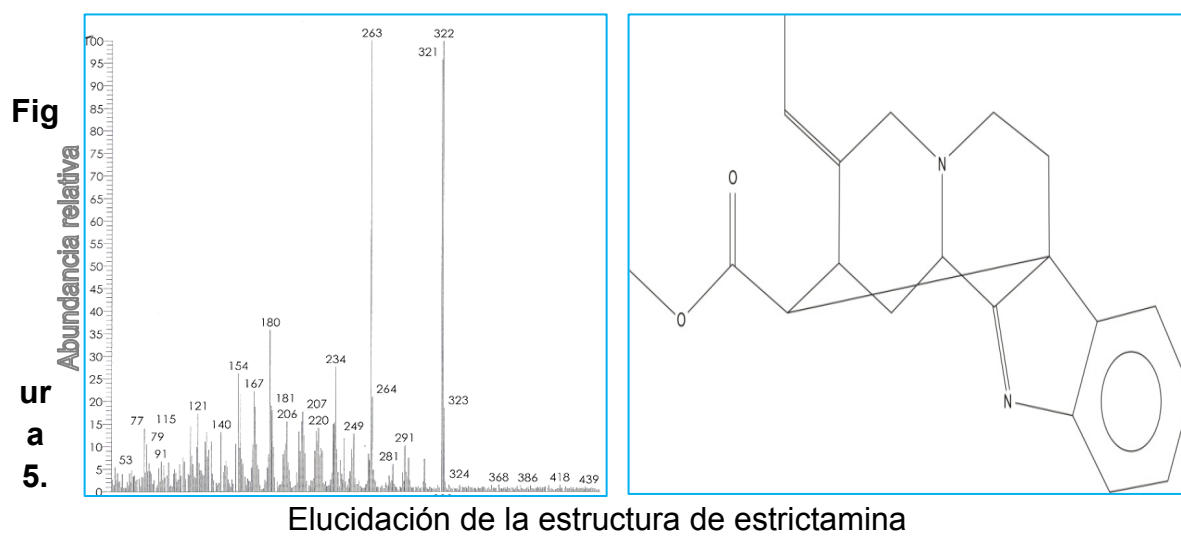
Tabla 4. Composición química del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

COMPONENTES QUÍMICOS	Tiempo de retención (minutos)
Estrictamina	14,13
Ibogamina	14,23
Secoaspidodasycarpina	14,52
Pseudokopsinina	14,52
Voacangina hidroxindolenina	15,31
Ibogaina	15,58
Voaluteina	15,99
Voacangina	16,18
Vincoridina	16,35
Akuammidina	16,81

4.5. Elucidación de los componentes químicos

En las figuras 5 a 14, se muestran los espectros de los siguientes componentes:

Espectros de los componentes químicos del extracto metanólico de la corteza *Brunfelsia grandiflora* D. Don.



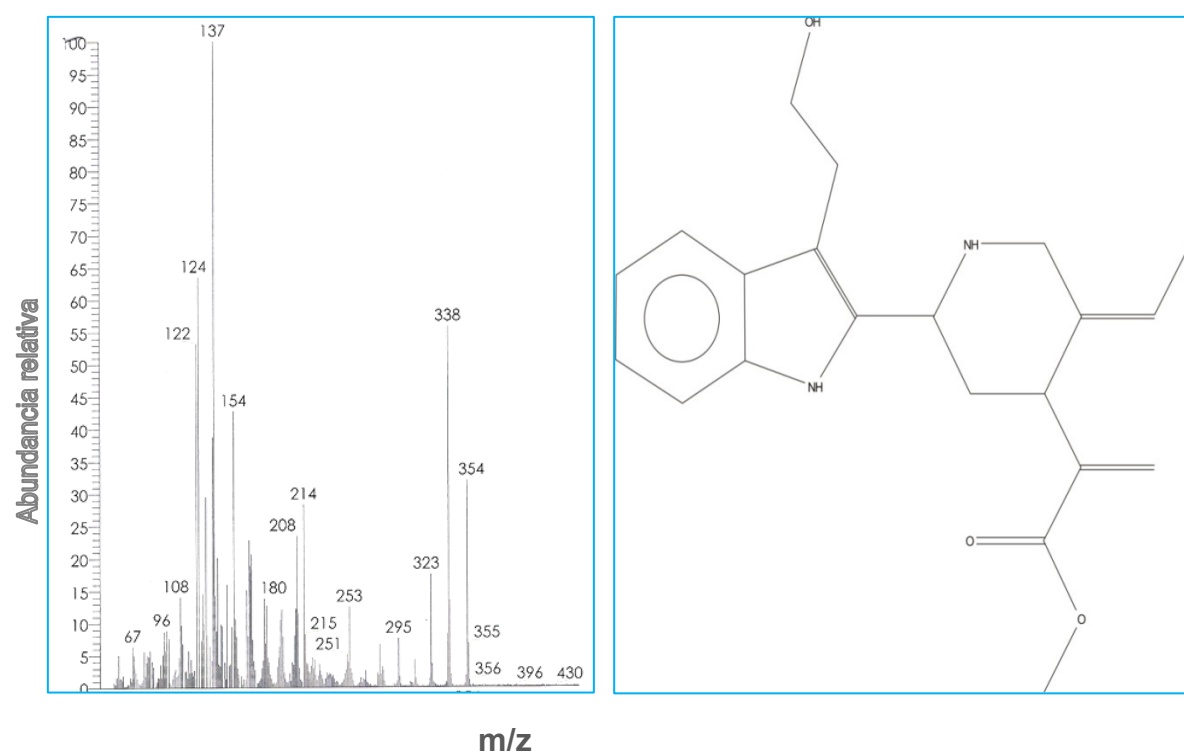


Figura 7. Elucidación de la estructura de secoaspidodasycarpina

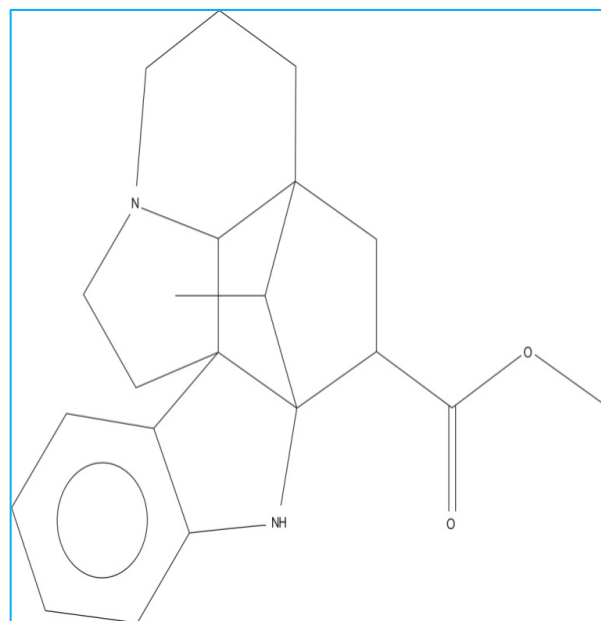
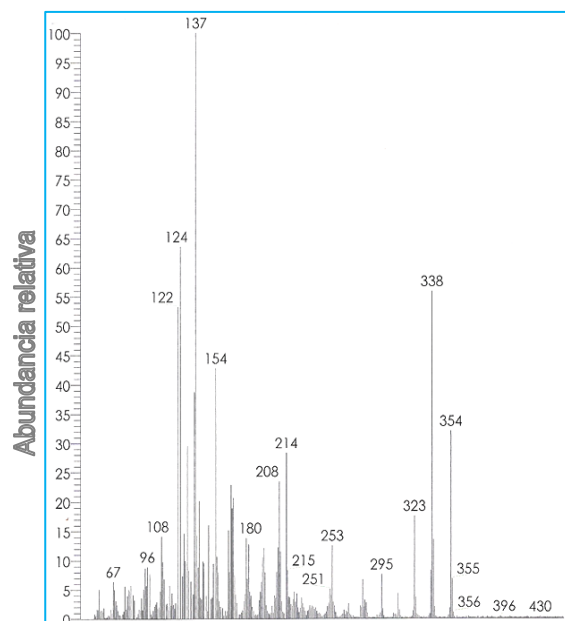


Figura 8. Elucidación de la estructura de pseudokopsinina

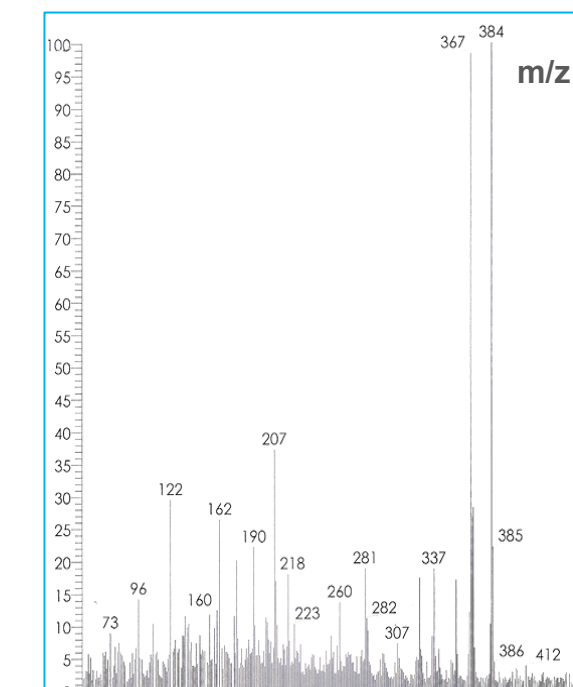
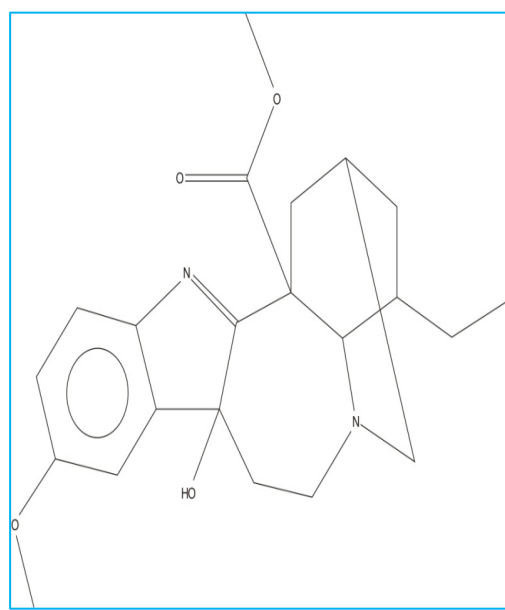


Figura 9. Elucidación de la estructura de voacangina
hidroxyindolenina



m/z

Abundancia relativa

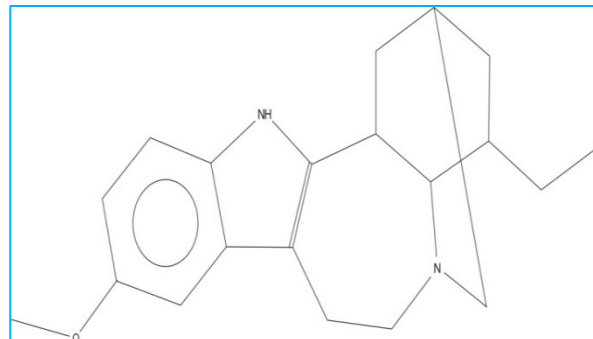
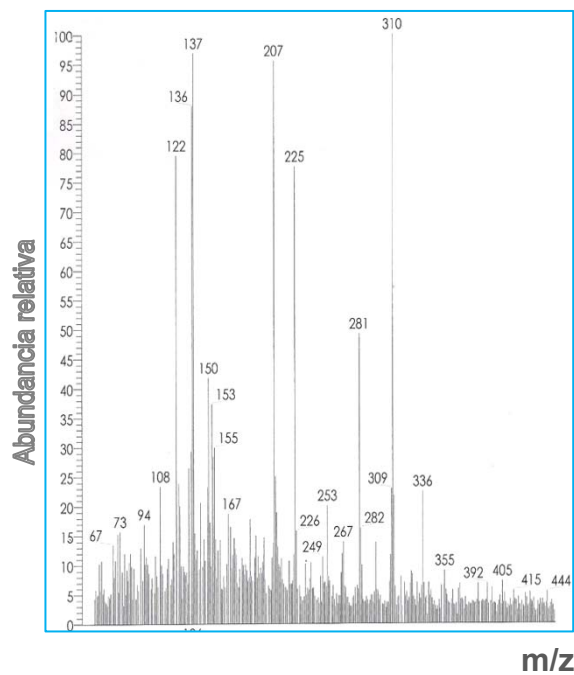


Figura 10. Elucidación de la estructura de ibogaina

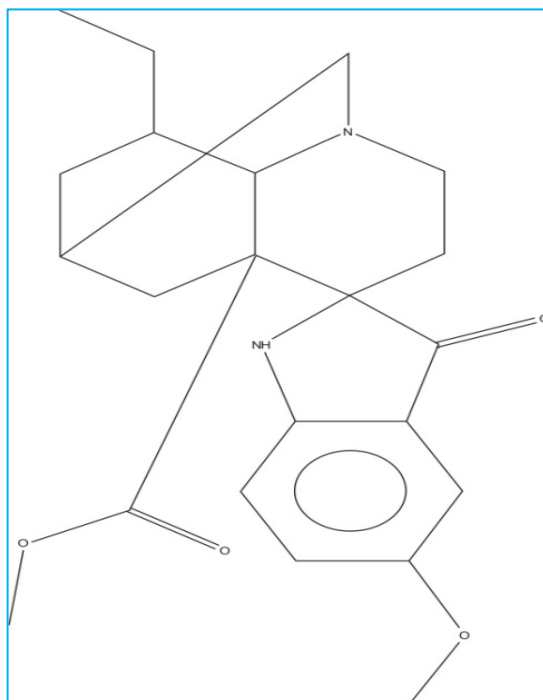
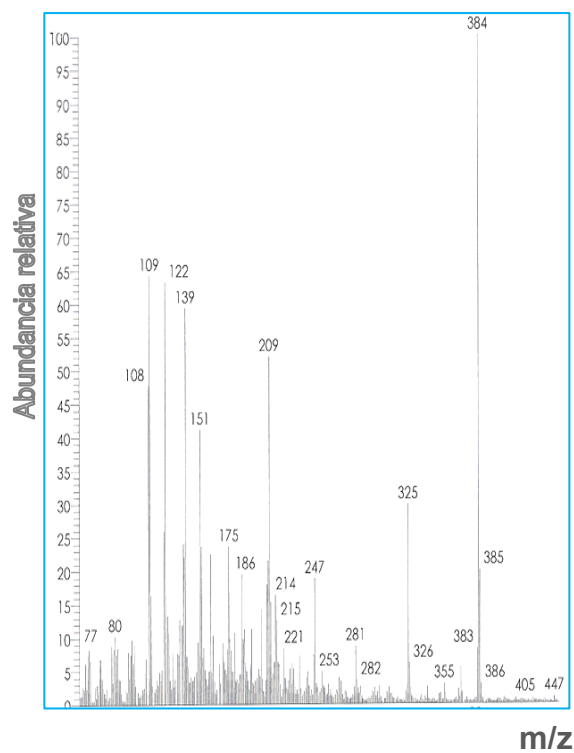


Figura 11. Elucidación de la estructura de voaluteina

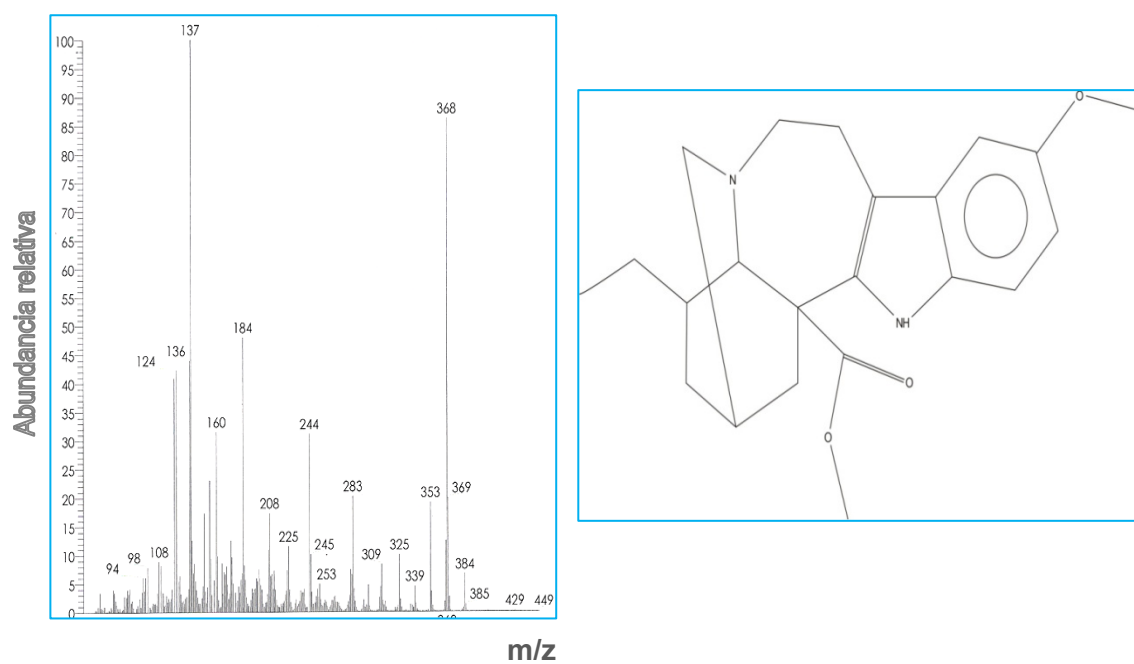


Figura 12. Elucidación de la estructura de voacangina

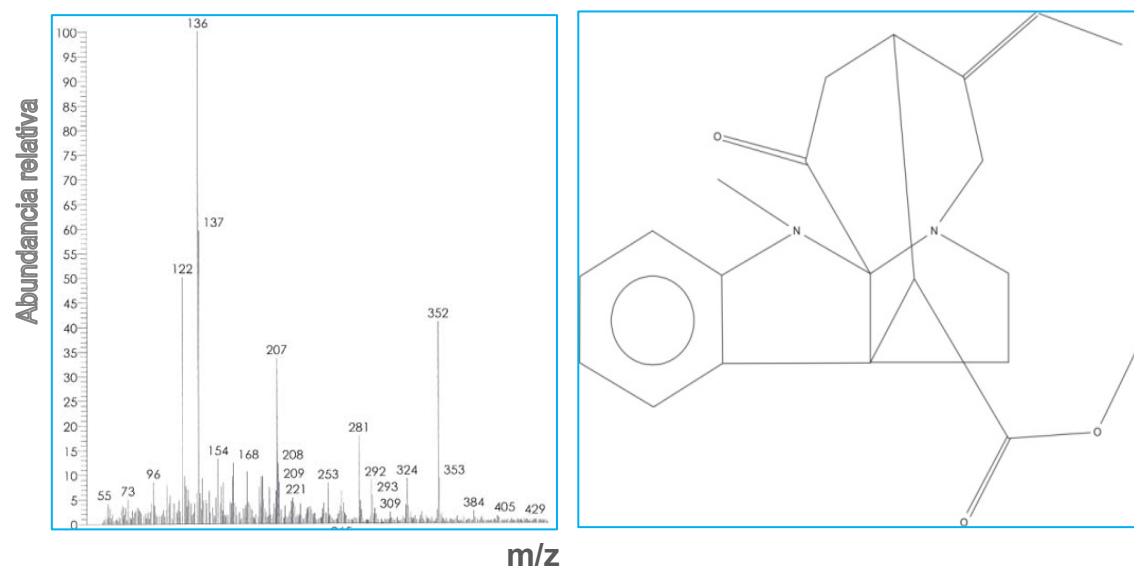


Figura 13. Elucidación de la estructura de vincoridina

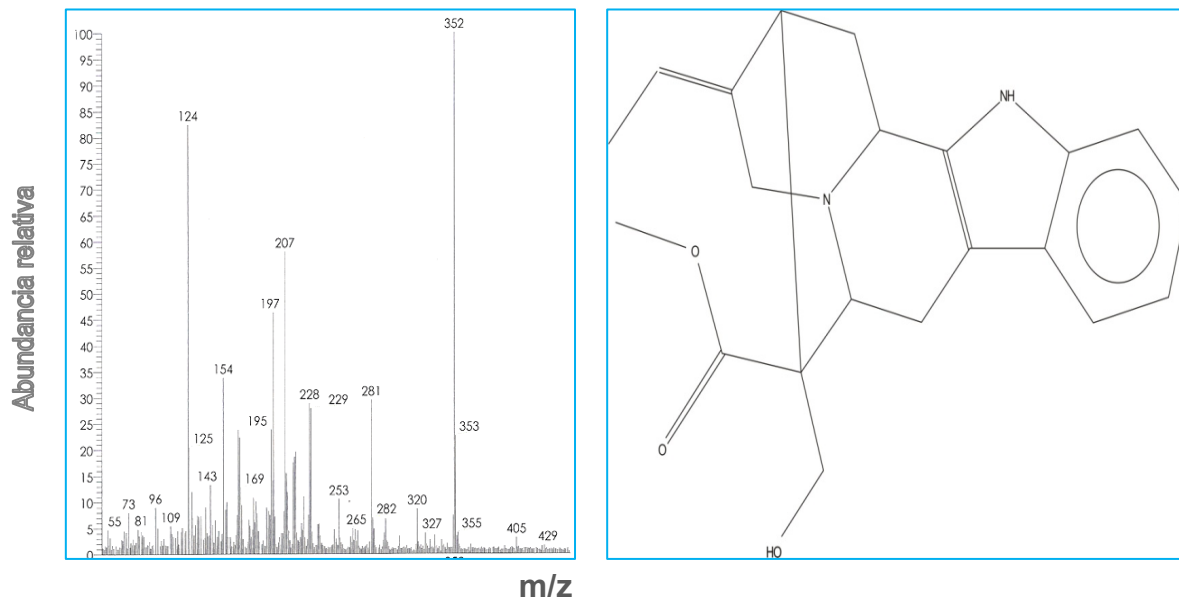


Figura 14. Elucidación de la estructura de la akuammidina

4.6. Determinación de la actividad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “Chiric sanango”.

Captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)

Los resultados obtenidos de la capacidad de captación del radical DPPH del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don comparado con el trolox, se presentan en la figura 15.

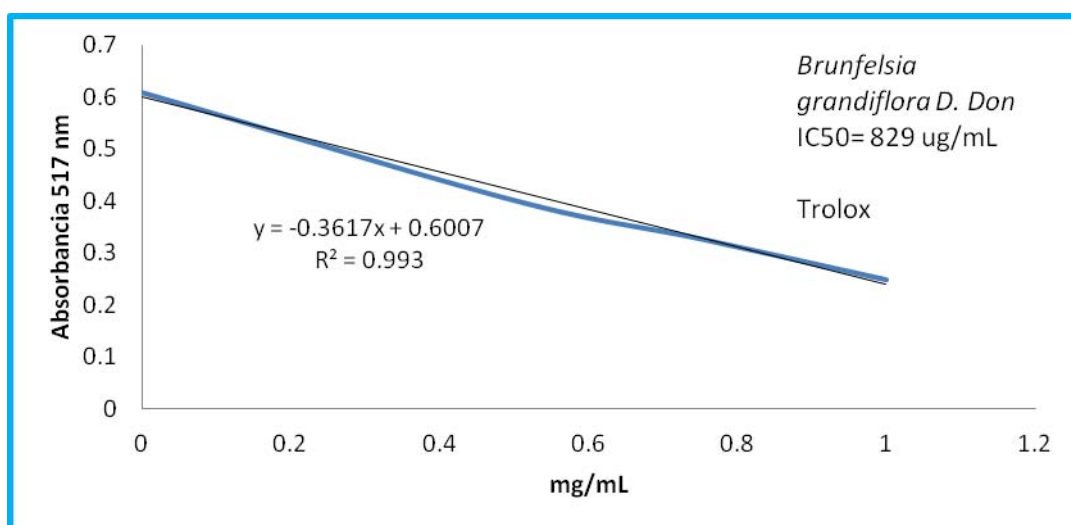


Figura 15. Curva de captación del DPPH de *Brunfelsia grandiflora* D. Don comparado con el trolox.

4.7. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don

El análisis de la actividad cicatrizante de la aplicación tópica del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don en pomadas al 1, 2 y 3%, incorporados en la base utilizada, permitió determinar la resistencia a fuerzas de tensión y la actividad cicatrizante del extracto en los grupos estudiados. La pomada al 3% demostró mayor eficacia de cicatrización, teniendo como valor de referencia el 100 % de resistencia a la tensión de la piel intacta.

4.8. Resultados del test de sensibilidad e irritabilidad

La observación en voluntarios, nos permitió evidenciar que las pomadas con el extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don al 1, 2 y 3% no producen reacciones de sensibilización.

Resultados experimentales

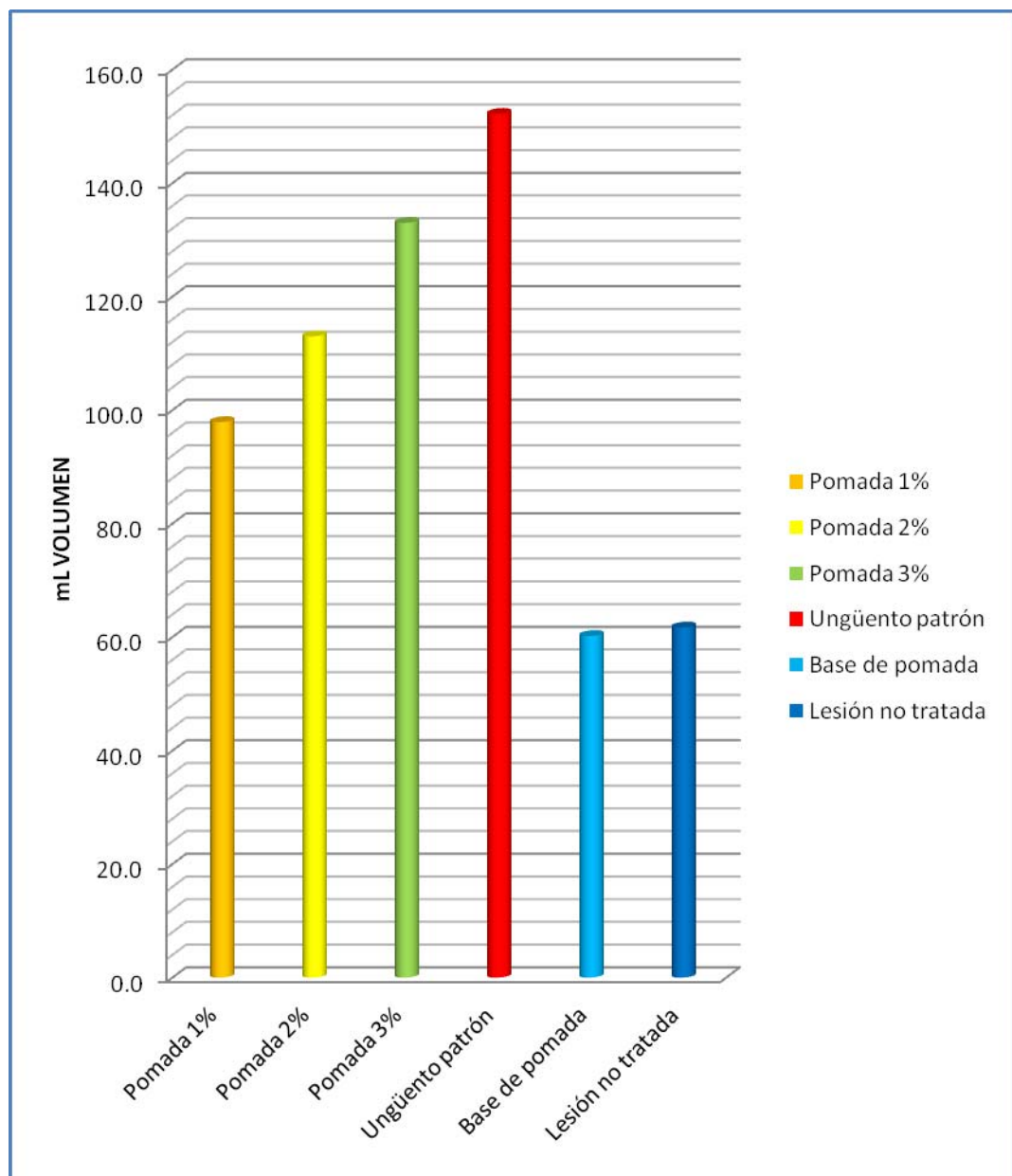


Figura 16. Resistencia media a la tensión en los grupos experimentales (en mililitros de agua).

G.L: Grados de libertad **F:** variable del análisis de varianza

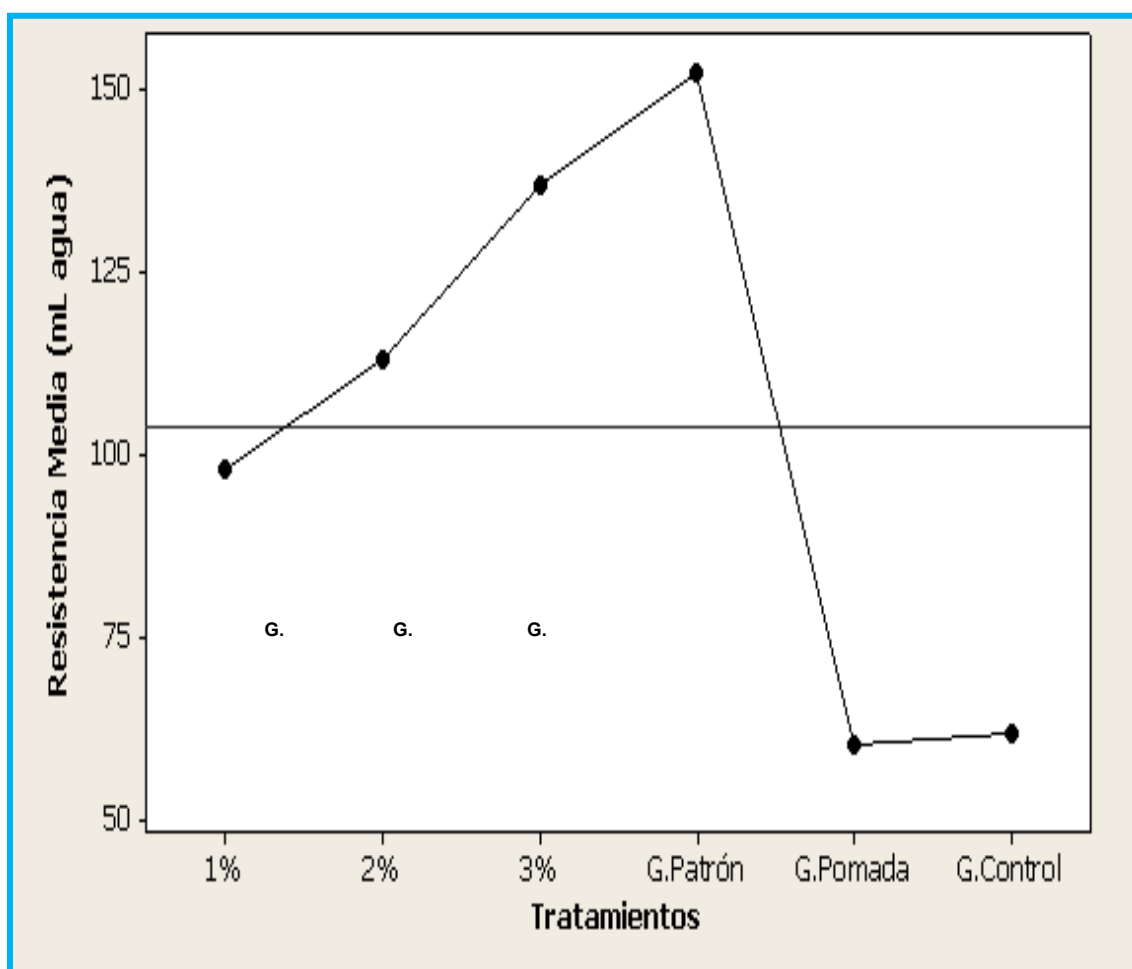


Figura 17. Efectos de los tratamientos sobre la resistencia de tensión.

La eficacia de cicatrización, se determina considerando como valor referencial de 100% al número de mililitros necesarios de resistencia a la tensión para abrir la piel intacta, según la siguiente expresión.

$$\% \text{ Eficacia de cicatrización} = \frac{\text{Mililitros necesarios para abrir la cicatriz tratada}}{\text{Mililitros necesarios para abrir la piel intacta}} \times 100$$

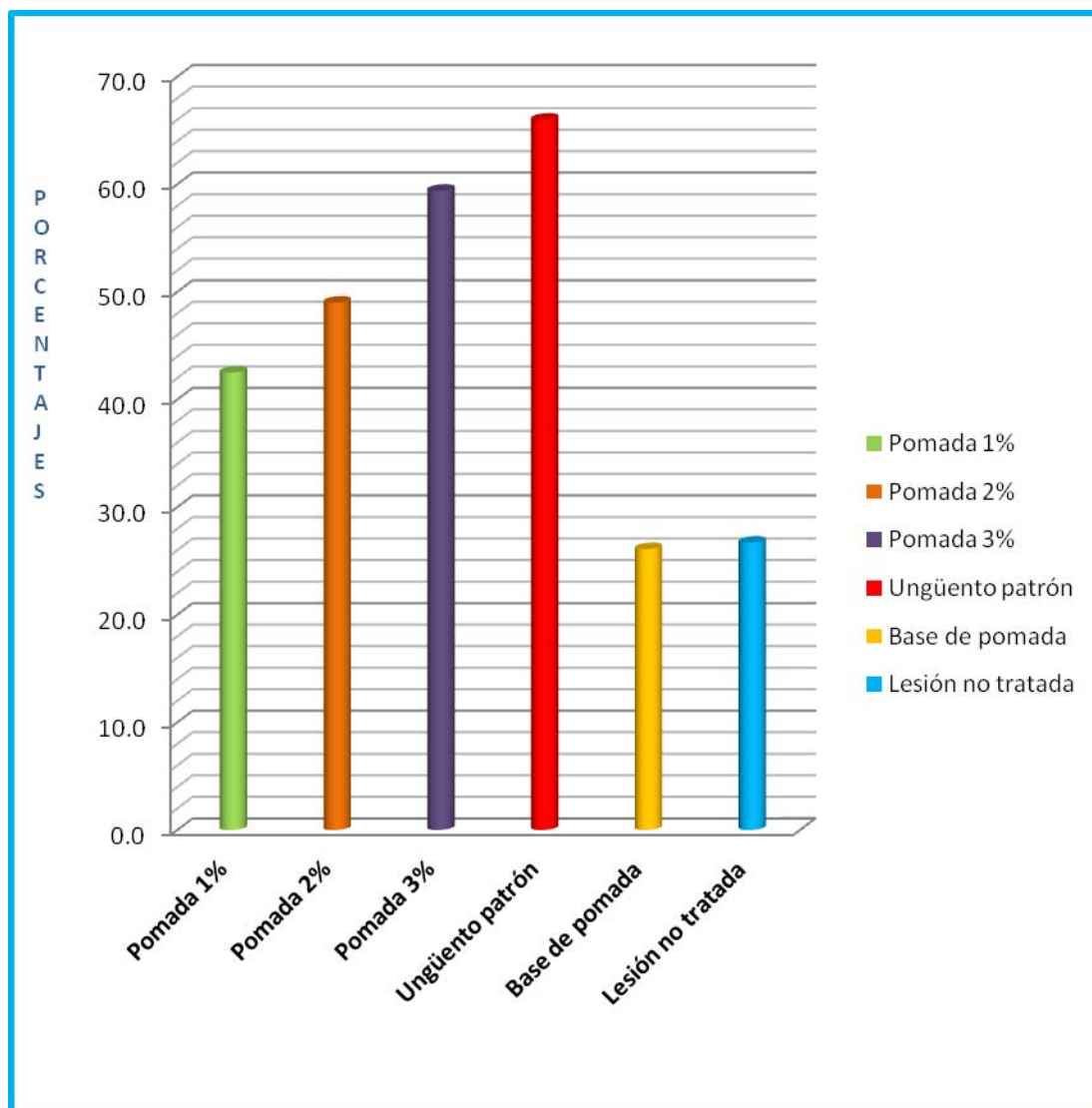


Figura 18. Eficacia de cicatrización de los grupos experimentales.

4.9. Estudio histopatológico

Tabla 5. Análisis de varianza

Fuente de Variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F	Significancia (p)
Tratamientos	5	43450,4	8690,1	420,84	0,000
Error	30	61,5	20,6		
Total	35	44069,9			

Tabla 6. Resultados del test de cicatrización por el método tensiométrico

Tratamiento	n	Promedio (ml agua)	Desviación estándar (mL agua)	Error estándar (%)	Eficacia de cicatrización (%)
Pomada al 1%	6	97,93	4,88	1,99	42,5
Pomada al 2%	6	113,05	3,08	1,26	49,0
Pomada al 3%	6	137,0	3,5	1,43	59,4
Ungüento patrón	6	152,27	3,23	1,32	66,0
Base de pomada	6	60,2	7,42	3,03	26,1
Lesión no tratada	6	61,73	3,58	1,46	26,7

Tabla 7. Comparación de los tratamientos con el grupo patrón

Fuente de Variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F	Significancia (p)
Tratamientos	4	30771,5	7692,9	346,24	0.000
Error	25	555,5	22,2		
Total	29	31326,9			

Se determina que existe diferencia significativa entre los efectos de los tratamientos (excluido el grupo control) en comparación con el del grupo patrón.

Prueba de Dunnett⁵³:

$$d_{0.01(4,25)} \sqrt{\frac{2S^2}{n}} = 3.32 \sqrt{\frac{2(22.2)}{6}} = 9.03$$

Un tratamiento debe considerarse significativamente diferente del grupo control si la diferencia es mayor que 9.03. Tomando en cuenta que la media del grupo patrón fue 152,3 obtenemos las siguientes diferencias con sus respectivos intervalos de confianza:

Tabla 8. Diferencia media e intervalos de confianza para la comparación de tratamientos menos la media del grupo patrón

Tratamiento	Inferior	Diferencia Media	Superior
Pomada al 1%	- 61,428	- 54,333	- 47,239
Pomada al 2%	- 46,311	- 39,217	- 32,122
Pomada al 3%	- 22,361	- 15,267	- 8,172
Grupo base pomada	- 99,161	- 92,067	- 84,972

De acuerdo a estos resultados, todas estas diferencias son significativas con respecto al grupo patrón, siendo más notoria su diferencia cuando se compara con la del grupo con base de pomada y la menor diferencia pero significativa es con respecto al grupo con pomada al 3%.

Ahora trataremos de comparar entre sí, los efectos entre los tratamientos exceptuando al grupo control, a través de la prueba de **TUKEY**⁵⁴.

Cualquier diferencia mayor en valor absoluto que:

$$DSH = q_{k, v, \alpha} \sqrt{\frac{CME}{n}}$$

Puede considerarse estadísticamente significativa. En este caso para $\alpha = 0.01$:

$$DSH = q_{k, v, \alpha} \sqrt{\frac{CME}{n}}$$

En este caso para $\alpha = 0.01$:

$$DSH = 5,15 \sqrt{\frac{22,2}{6}} = 9,91$$

Tabla 9. Tratamiento 1: Pomada al 1% restado de:

Tratamiento	Inferior	Diferencia Media	Superior
2%	7,13	15,12	23,10
3%	31,08	39,07	47,05
G. Base Pomada	- 45,72	- 37,73	- 29,75
G. Patrón	46,35	54,33	62,32

Se observa que todos los tratamientos superan en forma significativa a la resistencia media de la pomada al 1%, excepto el grupo base pomada. También se observa los intervalos de confianza para dichas diferencias en cada caso.

Tabla 10. Tratamiento 2: Pomada al 2% restado de:

Tratamiento	Inferior	Diferencia Media	Superior
3%	15,96	23,95	31,94
G. Base Pomada	- 60,84	- 52,85	- 44,86
G. Patrón	31,23	39,22	47,20

Se observa que los tratamientos: pomada al 3% y el grupo patrón superan en forma altamente significativa a la resistencia media de la pomada al 2%.

Tabla 11. Tratamiento 3: Pomada al 3% restado de:

Tratamiento	Inferior	Diferencia Media	Superior
G. Base Pomada	- 84, 79	- 76,80	- 68,81
G. Patrón	7,28	15,27	23,25

Se observa que el tratamiento grupo patrón supera en forma significativa a la resistencia media de la pomada al 3%.

Tabla 12. Tratamiento 4: Grupo base de pomada restado de:

Tratamiento	Inferior	Diferencia Media	Superior
G. Patrón	84,08	92,07	100,05

Observándose que el tratamiento del grupo patrón supera en forma significativa a la resistencia media del grupo de la base de pomada.

4.10. Análisis estadístico

Al realizar el estudio del efecto cicatrizante del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don y la evolución histológica en la cicatrización de heridas en el lomo de ratones a los tres y siete días, los resultados fueron los siguientes:

- a. A los tres días de producida la incisión y aplicadas las pomadas, no se observó actividad en la cicatrización encontrándose células epidérmicas basales incipientes y presencia de costra. En la dermis se observan escasos vasos sanguíneos, abundante tejido conjuntivo y presencia de macrófagos e histiocitos.
- b. El efecto cicatrizante de la pomada al 1% está ausente, el de la pomada al 2% es incompleto y el de la pomada al 3% no presenta actividad terapéutica como cicatrizante.
- c. El efecto terapéutico del patrón cicatrizante Clorelase® y el de la lesión sin tratamiento, son incipientes; para la pomada base solo hay aparición de costra. (Figuras 19 - 24).
- d. El modelo de Howes *et al*, se complementa con el análisis histológico, debido a que existe relación entre el aumento de la resistencia a la fuerza de tensión, y la evolución positiva histológica del tejido a la resistencia que ofrece a la ruptura.
- e. A los siete días de producida la incisión, y aplicados los productos a ensayar, se observa actividad cicatrizante en la evolución histológica de las heridas; notándose, con la aplicación de la pomada al 1%, presencia de tejido epitelial en el estrato basal y abundante tejido

conjuntivo con presencia de macrófagos e histiocitos, en la dermis; ésta pomada no presenta efecto en la cicatrización.

- f. La pomada al 2% presenta; en la epidermis, tejido epitelial y en la dermis afrontamiento, regular tejido conjuntivo y presencia de macrófagos e histiocitos; por lo tanto presenta efecto cicatrizante incompleto.
- g. La pomada al 3%, en el estrato basal de la epidermis presenta afrontamiento, abundante tejido conjuntivo y presencia de macrófagos e histiocitos. Ésta pomada presenta un efecto cicatrizante de afrontamiento.
- h. El patrón farmacológico Clorelase® presenta: en la epidermis un estrato basal débil y en la dermis regular tejido conjuntivo, presencia de macrófagos e histiocitos; por lo tanto presenta unión de cicatrización más avanzado.
- i. El efecto de cicatrización en la incisión sin tratamiento, muestra en la epidermis estrato córneo laminar y presencia del estrato basal o capa germinativa; en la dermis se observa presencia de vasos sanguíneos, abundante tejido conjuntivo y presencia de macrófagos e histiocitos; en ésta lesión la cicatrización es incompleta.
- j. El efecto cicatrizante de la pomada base, presenta en la dermis afrontamiento y abundante tejido conjuntivo con presencia de macrófagos e histiocitos; ésta lesión sólo expresa cicatrización incompleta. (Figuras 25 - 30).

Estudio histopatológico del test de cicatrización

Tabla 13. Evolución histológica en la cicatrización de heridas tratadas con muestras del extracto de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don, ungüento Clorelase®, incisión sin tratamiento y con base de pomada.

A los tres días							A los siete días					
Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
	Pomada 1%	Pomada 2%	Pomada 3%	Ungüento Clorelase®	Sin tratamiento	Pomada base	Pomada 1%	Pomada 2%	Pomada 3%	Ungüento Clorelase®	Sin tratamiento	Pomada base
Tejido epitelial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estrato córneo	0	0	No	No	No	Costra incipiente	-	-	-	-	Laminar	No
Estrato espinoso	0	0	-	-	-	Costra incipiente	-	-	-	-	-	-
Estrato basal	0	0	-	Incipiente	-	Incipiente	Epitelial	Epitelial	Afronta	Débil	Presente	-
DERMIS	-	-	-	-	-	Granulación	-	Afronta	-	-	Presente	Afronta
Vasos sanguíneos	Escaso	-	-	Escaso	Presente	-	-	Afronta	-	-	Presente	Afronta
Tejido conjuntivo	Abundante	Más	No	Abundante	Abundante	-	Abundante	Regular	Abundante	Regular	Abundante	Abundante
Tejido fibroso	-	-	-	-	Presente	-	-	-	-	-	-	-
Macrófagos	-	10	10	20	20	-	18	18	22	18	30	26
Histiocitos	-	4	4	10	10	-	6	10	12	6	8	10
Eritrocitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibras elásticas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicatrización	Ausente	Incompleta	No	Incipiente	Incipiente	Costra	No	Incompleta	Afronta	Unión	Incompleta	Incompleta

a. Observación de los cortes histológicos del lomo de ratón en evolución cicatrización de los grupos A1-A6 a los tres días

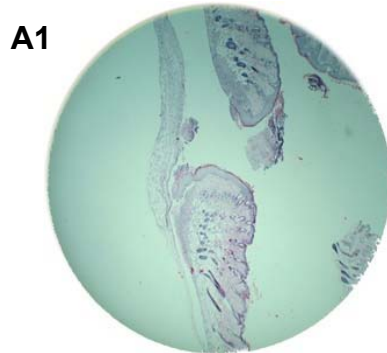


Figura 19. Corte histológico del grupo control sin tratamiento. H&E,25X

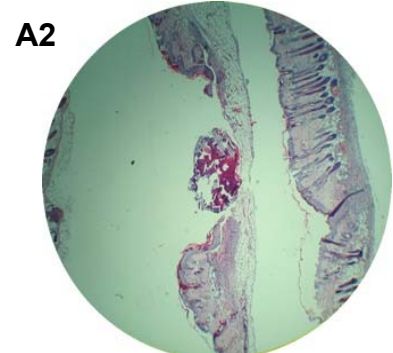


Figura 20. Corte histológico del grupo de pomada base. H&E,25X

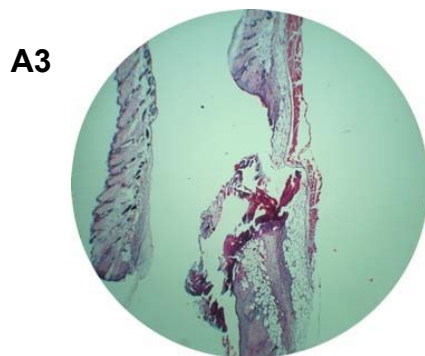


Figura 21. Corte histológico del grupo patrón Clorelase®. H&E,25X

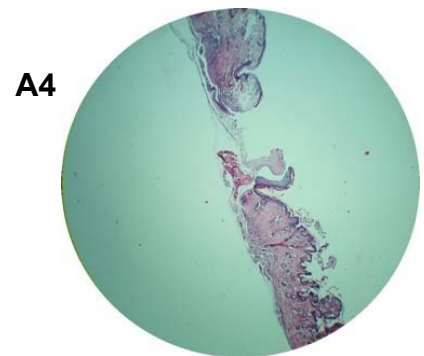


Figura 22. Corte histológico del grupo de pomada al 1%. H&E,100X

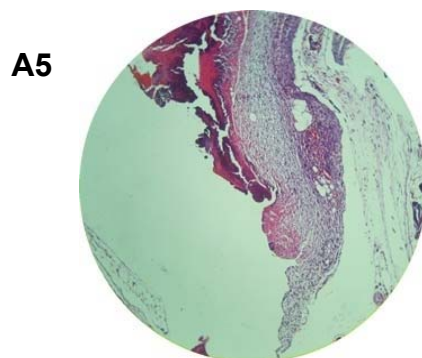


Figura 23. Corte histológico del grupo de pomada al 2%. H&E,100X

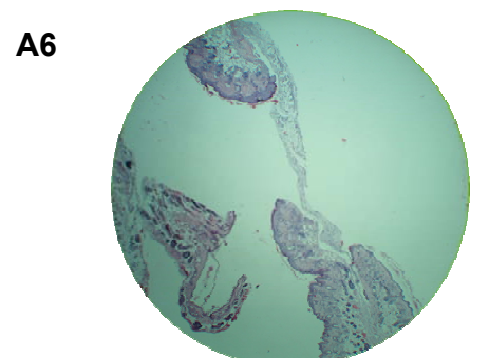


Figura 24. Corte histológico del grupo de pomada al 3%. H&E,100X

b. Observación microscópica de los cortes histológicos del lomo de ratón en evolución cicatrizante de los grupos A7-A12 a los siete días

A7

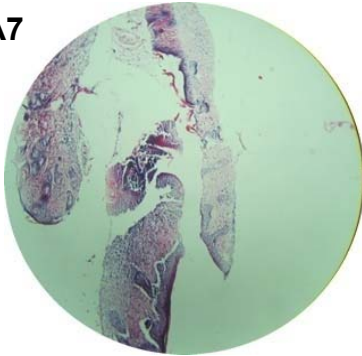


Figura 25. Corte histológico del grupo control sin tratamiento. H&E, 25X

A8

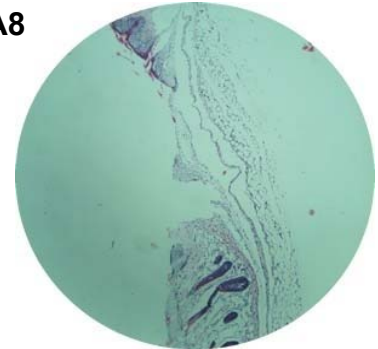


Figura 26. Corte histológico del grupo de pomada base. H&E, 25X

A9

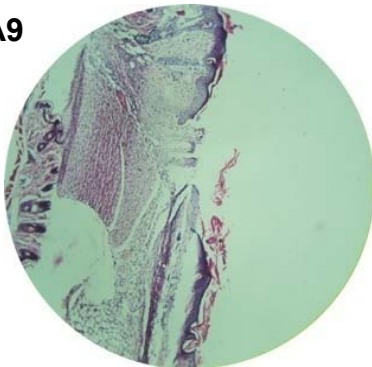


Figura 27. Corte histológico del grupo patrón: Clotrelase®. H&E, 25X

A10

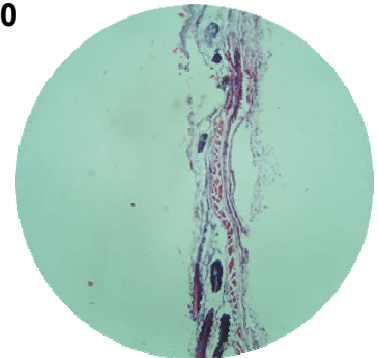


Figura 28. Corte histológico del grupo de pomada al 1%. H&E, 100X

A11

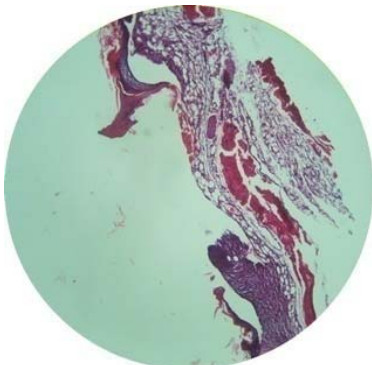


Figura 29. Corte histológico del grupo de pomada al 2%. H&E, 100X

A12

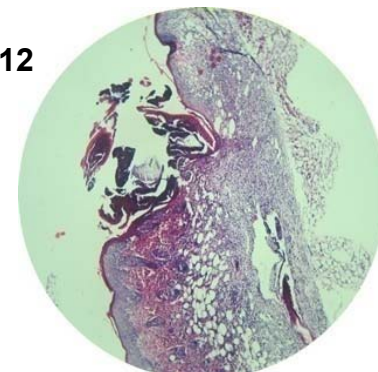


Figura 30. Corte histológico del grupo de pomada al 3%. H&E, 100X

V. DISCUSIÓN

El uso de plantas en el tratamiento de enfermedades, basado en la medicina popular y sin estudios etnobotánicos ni etnofarmacológicos, no suele ir de la mano con un real conocimiento de sus propiedades terapéuticas y de sus actividades, que ofrezcan parámetros que justifiquen y afirmen su aplicación como una aceptable alternativa para la salud pública.

Actualmente, en la medicina occidental, la leishmaniasis es tratada con la administración de drogas potencialmente tóxicas como el estibogluconato de sodio o antimoniato de N-metilglucamina y con pentimidina o anfoterecina B. Sin embargo, en las regiones endémicas, la población utiliza especies vegetales disponibles de la zona que contienen principios activos con propiedad farmacológica de acción cicatrizante⁵⁵.

Una de estas especies es *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango”, de la cual se sabe, que se usa en la Amazonía como cicatrizante para lesiones producidas por *Leishmania* y que, en la literatura especializada, se ha reportado que posee dentro de su composición química: ácido láctico, ácido tartárico, ácido quínico y escopoletín². Sin embargo, no existen estudios sobre los componentes químicos presentes en su corteza, así como tampoco de la actividad cicatrizante que se le atribuye.

El resultado del ensayo de solubilidad del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don, nos dio a conocer que el mencionado extracto contiene componentes químicos mayoritariamente solubles en solventes de polaridad media como: metanol, acetato de etilo, acetona, y cloroformo (Tabla 1). En la marcha fitoquímica, utilizando reactivos de coloración y precipitación (Tabla 2), se detectó la presencia de alcaloides y la ausencia de triterpenoides y esteroides, taninos, fenoles y flavonoides⁴⁰.

En el análisis cromatográfico en capa fina con el uso del sistema ácido acético/metanol/acetato de etilo/cloroformo: (0.5:2:2:6) y revelado con luz UV 254 nm y el reactivo de Dragendorff, se detectó la presencia de compuestos

nitrogenados de naturaleza alcaloídica, los que actuando en sinergismo expresarían la bioactividad farmacológica cicatrizante que se le atribuye según la medicina tradicional (Tabla 3).

En la determinación cualitativa de la composición química del extracto metanólico de la corteza, por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), en base a su tiempo de retención (TR), el resultado permitió identificar y elucidar una conformación de componentes químicos de naturaleza nitrogenada de tipo alcaloide indólico: Estrictamina, ibogamina, secoaspidodasycarpina, pseudokopsinina, voacangina hidroxindolenina, ibogaina, voaluteina, voacangina, vincoridina y akuammidina.

Fuchino *et al.* aislaron del extracto metanólico de las hojas de la misma especie una nueva saponina, furostan de tipo 1, con cuatro compuestos conocidos, se determinaron, por análisis espectroscópico y reacción química, que la estructura de la saponina fue: 26-O-beta-D-glucopyranocyl 22 alpha-metoxifyurostan-3 beta, 26-diol 3-O-beta-D-xylopyranosyl (1→3)- {beta-D-glucopyranosyl (1→)}-beta-D-glucopyranocyl (1→4)-beta-D-glucopyranoside. Este compuesto mostró una potente actividad leishmanicida *in vitro* frente a *Leishmania major*. Tres de los cuatro compuestos aislados correspondieron al ácido ursólico, ácido clorogénico y escopoletín; que presentaron moderada actividad leishmanicida⁹⁻¹¹. El cuarto compuesto fue el cirensenoside P (3-O-β-D-glucopyranocyl, 28-oxígeno-β-D-glucopyranocyl (1→6) -D-glucopyranocyl betulinate): La actividad leishmanicida para este compuesto no se realizó debido a la escasa cantidad obtenida.

De la especie *Tabernante iboga*, perteneciente a la familia Apocynaceae, más conocida como iboga, se han aislado los siguientes componentes químicos de naturaleza alcaloide indólica: ibogamina, ibogaina, vocangina y tabernanthina⁵⁶. Los tres primeros también han sido identificados en nuestro estudio. Ibogaina tiene acción alucinógena y es utilizado en el tratamiento de la adicción a opiáceos, metanfetamina y otras drogas; su adicción como alucinógeno afecta al cerebro⁵⁷⁻⁵⁸. Su efecto terapéutico más estudiado en la reducción o eliminación de adicción a opiáceos. Investigaciones realizadas

sobre este alcaloide, sugieren que puede ser empleados en el tratamiento de la adicción al alcohol y a la nicotina^{59,60}.

El alcaloide indólico voacangina, es el éster metílico del ácido 18-carboxílico 2-metoxiibogamina, el cual sirve como semiprecursor para la síntesis de ibogaina⁶¹. Se ha demostrado en animales que tiene las mismas propiedades antiadictivas que la misma ibogaina⁶². La voacangina es otro de los alcaloides indólicos que ha sido identificado en el extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don de la familia solanaceae.

La akuammidina, es otro de los alcaloides con núcleo indólico que ha sido identificado en nuestro estudio. Se encuentra en las semillas de *Pirralima nítida*, Stapf. Es de acción simpaticolítica potente¹⁴.

Otro de los alcaloides de núcleo indólico identificado en la investigación realizada es la vincoridina. También se le ha encontrado en la especie *Vinca minor* L.⁶³.

La Pseudokopsinina es otra de las bases presentes en el extracto metanólico de la corteza de *Brumfelsia glandiflora* D. Don que ha sido identificada y elucidada por análisis de Cromatografía de Gas y Espectrometría de Masas. Este alcaloide indólico se le ha aislado de las especies *Vinca erecta* y *Vinca major*⁶⁴.

La estrictamina, otro de los alcaloides básicos de núcleo indólico identificado por el análisis espectroscópico, se le ha aislado de las hojas de *Rhazya stricta*. La investigación realizada, sobre la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la malaria con plantas medicinales de la región Amazónica Perú-Bolivia; se consideró entre otras especies a *Brumfelsia glandiflora* D. Don, realizándose el trabajo con extracto acuoso, etanólico y diclorometánico. La evaluación de la actividad antiplasmódica *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum*, se realizó sobre el efecto antiparasitario⁶⁵.

Los agentes antioxidantes pueden ser desde moléculas simples, hasta compuestos muy polimerizados con elevado peso molecular, como es el caso de los polifenoles con capacidad quelante y donadora de hidrógeno. Los radicales libres tienen carácter electrofílico y atacan lugares con alta densidad

electrónica, tales como uniones de oxígeno y grupos que contengan nitrógeno o el grupo sulfidrilo presente en el glutatión⁶⁶.

En la determinación de la actividad antioxidante de la muestra en estudio, por el método de captación del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), se observa un IC₅₀ de 829 µg/mL, bastante alejado al valor referencial del trolox de IC₅₀ de 3,7 µg/mL, sustancia antioxidante referencial. El extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don, no presentó actividad oxidante significativa en comparación con la sustancia de referencia.

El contenido de compuestos bioactivos del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don, conformado por la presencia de un elevado número de alcaloides básicos, podría ser una causa de su baja actividad antioxidante. Esto se debería a las estructuras nitrogenadas moleculares de sus componentes químicos de naturaleza alcaloídica e indólica.

En el estudio del extracto realizado se han identificado y elucidado por análisis cualitativo Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/EM), 10 componente químicos de alcaloides indólicos. En la literatura bibliográfica no se reportan investigaciones sobre el extracto de su corteza, por lo que no puede establecerse confrontaciones de los resultados obtenidos, constituyendo lo estudiado un conocimiento de base para posteriores estudios.

Los flavonoides se encuentran también al estado libre como glicósidos en las plantas y les confieren una diversidad de colores a muchas flores, hojas, frutos y semillas. Son empleados como colorante de lana y en conservación de grasas o jugos de frutas debido a sus propiedades antioxidantes^{44,67}.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el efecto de tratamiento del grupo patrón, es el que registra mayor resistencia de tensión que el resto de tratamientos, seguida en orden creciente de las tensiones de los grupos de pomadas del extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don en concentraciones de 1, 2 y 3% respectivamente.

En el análisis histopatológico a los tres días de producida la incisión y aplicadas las pomadas no se observó actividad de cicatrización. En la

evolución histológica a los siete días con la pomada al 2 y 3 % se nota cicatrización incompleta y afrontamiento. En la incisión sin tratamiento y en la lesión con aplicación de la pomada base presenta cicatrización incompleta. La cicatrización más avanzada se manifiesta con el patrón farmacológico.

De lo expresado, se deduce que el efecto cicatrizante de la forma farmacéutica de pomada en el lomo de ratones, elaborada con el extracto metanólico de la corteza al 3% de *Brunfelsia grandiflora* D. Don, en la observación microscópica del corte histológico se aprecia afrontamiento y evolución de cicatrización más avanzada y cercana al de unión del grupo patrón farmacológico, presentando una cicatrización con mayor resistencia a rotura frente a las concentraciones de las pomadas al 1 y 2% respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

- En el extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don se elucidaron los siguientes componentes químicos de naturaleza nitrogenada tipo alcaloide indólico: Estrictamina, ibogamina, secoaspidodasycarpina, pseudokopsinina, voacangina hidroxindolenina, Ibogaina, voaluteina, voacangina, vincoridina y akuammidina.
- El extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia glandiflora* D. Don, no presenta actividad antioxidante significativa en comparación con el trolox, sustancia antioxidante referencial.
- Se determinó que el extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don, presenta actividad cicatrizante externa en la forma farmacéutica de pomada al 3%, evidenciándose en los cortes histológicos de lesiones por incisión en el lomo de ratón mediante análisis histopatológico del test de cicatrización.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinedo M, Rengifo E, Cerruti T. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana: Estudio de su uso y cultivo. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP). Iquitos. 1997: 103.
2. Brack Egg A. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles en el Perú, Cusco. Editorial: Centro Bartolomé de las Casas, 1999:82.
3. Evans S, Hofmann A, Ratsch C, Plants of the Gods: Their Sacred, Healing and Hallucinogenic Powers. (updated version) EMB – Service for Publishers, Lucerne- Switzerland.1998
4. Desmarchelier C, Schaus FW. “Sixty Medicinal Plants from the Peruvian Amazon. Ecology, Ethnomedicine and Bioactivity” 1 st. ed. Perú, Privately Published, 2000.
5. Lloyd HA, Fales HM, Golman ME, Jerina DM, Plowman T, Schultes RE, Tetrahedron Lett. 1985; 26: 2623-4.
6. Brunner G, Burger U, Castioni P, Kapetanidis I, Christin P, Phytochem. Anal., 2000; 11: 29-33.
7. Soukup J. Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros. Lima, Editorial Salesiana; 1987:92.
8. Muñoz AM, Pareja B. Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de la leishmaniasis. Dermofarmacia. *Folia dermatol* 2003; 14 (3): 10-4.
9. Torres - Santos EC, Lopes D, Oliveira RR, Carauta JP, Falcao CAB. Kaplan MAC, Rossi- Bergman B, Phytomedicine, 2004; 11: 114-20.
10. Kirmisibekmez H, Calis I, Perozzo R, Doenmez AA, Linden A, Rueedi P, Tasdemir D. Planta Med. 2004; 70:711-7.
11. Camacho MR, Phillipson JD, Croft SL, Kirby GC, Warhurst DC, Solis PN. Terpenoides de *Guarea rhopalocarpa*. Phytochemistry, 2001; 56(2):203-10.
12. Quimper M. Malaria en la Región Loreto: Investigación para el Proyecto Integrado de Malaria en la Región Loreto. CARE – Perú, Julio 1998.
13. Fuchino H, Sekita S, Mori K, Kawahara N, Satake M, Kiuchi F. A new leishmanicidal saponin from *Brunfelsia grandiflora*. Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Japan. [Chem Pharm Bull \(Tokyo\)](#). 2008 Jan;56(1):93-6

14. Guzmán G. Alcaloides de núcleo indólico: Algunos experimentos para la determinación de las estructuras de akuammidina. Trabajo experimental realizado en The Dyson Perrins Laboratory, Universidad de Oxford. Resumen presentado en la VII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física y Química, Valencia, 27 noviembre 1955.
15. Murillo E. Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de té comercializadas en Costa Rica. Instituto de Alimentación y Nutrición. Universidad de PANAMÁ, 2005.
16. Pokony J, Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidantes de los alimentos y aplicaciones prácticas. 1ra. Edición, Zaragoza. Editorial Acribia. 2001.
17. Shahidí F, Janitha P, Wanasundara P. Phenolic Antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1992; 32 (1):67-103.
18. Bravo L. Polyphenols. Chemistry, dietary, sources, metabolism and nutritional significance. Nutr. Rev. 1998; 56(3):317-33.
19. Ramos IM, Batista GC, Gómez MB, Zamora PA. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Rev. Investigación en Salud. 2006; 7(1):7-15.
20. Escudero B, Sánchez J, Borrás S, Serrat J. Estructuras y Función del cuerpo humano. Mc Graw Hill- Interamericana. 15 Edición. Madrid, 1995:92-3.
21. Weisburger JH. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. Food Chem. Toxicol. 1999; 37(9):943-8.
22. Gerard J, Reynolds. Principios de Anatomía y Fisiología. 7ma. Edición. Madrid Mosby- Doyma Libros, 1996:127-37.
23. Brito N y col. Microscopic aspects of the cicatrization of treated open cutaneous wounds with oil of Copaiba in rats. Revista para Med. Sao Paulo 1999.
24. Kumar C, Collins R. Patología Estructural y Funcional. 6ta. Edición. México DF Editorial Interamericana Mc Graw- Hill Interamericana, 2000.
25. Bertran G, Katzung T. Farmacología Básica y Clínica. 8va. Edición. México DF. Editorial. El Manual Moderno, 1991.
26. Robbins C. Inflamación, Patología Estructural y Funcional. 4ta. México DF. Edición Volumen I. Editorial Interamericana., 2001.
27. Schwartz SS. Principio de Cirugía. 5ta. Edición Volumen I. México DF. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana, 1990.

28. Velásquez G, Gallardo D. Fisiología de la sangre del sistema inmunológico. UNMSM-UPSMP, Lima, 1996.
29. Trillo F. Farmacia Galénica 1ra. Edición. Madrid. Editorial Limusa S.A, 1993:625-30.
30. Las pomadas. [En línea] (Revisado el 11-04-2011). Disponible en: [www.eazel.com/sp/noticias/salud/las pomadas](http://www.eazel.com/sp/noticias/salud/las_pomadas).
31. Pomadas. [En línea] (Revisado el 24/04/2011). Disponible en: www.fyb.uba.ar/farmacotecnia.
32. Cerdo. [En línea] (Revisado el 16/04/2011). Disponible en: www.es.Wikipedia.org/wiki/cerdo.
33. Medicamentos de origen vegetal: Tendencias actuales. Medicina Bioenergética. [En línea] (Revisado el 28-04-2011). Disponible en: www.medbioenergetica.com.ar.
34. Bailey AE. Aceites y grasas industriales. Barcelona. Editorial Reverté S.A., 1980.
35. Fieser LF y Fieser M. Química Orgánica Fundamental. Barcelona. Editorial Reverté S.A. 2004.
36. Grasa comestibles: Manteca de cerdo y sebo. [En línea] (Revisado el 16/04/2011). Disponible en: www.elergonomista.com/alimentos/manteca.
37. Juárez EJ. Obtención y purificación de la manteca de cerdo: Diseño y formulación de las bases dermocosméticos para la incorporación de extractos vegetales (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 2008:33-4.
38. Cardoso de Martínez CA, Mrad de Osorio A. Ética en investigación con animales: Una actitud responsable y respetuosa del investigador con rigor y calidad científica. Revista Latinoamericana de Bioética. Universidad Militar Nueva Granada. Colombia. 2008; 8 (2): 46-71.
39. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón Centro Nacional de Productos Biológicos. Instituto Nacional de Salud. Lima, 2008:23-31.
40. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en estudios de productos naturales. 2ª. Edición. Lima. Fondo Editorial PUCP, 1994:8 - 10.

41. Farmacopea de los Estados Unidos de América y Formulario Nacional (USP 31-NF 26). Maryland. The United States Pharmacopeial Convention. 2008.
42. Elsner P. y Maibach HI. Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics. New York. Ed. Marcel Dekker, Inc., 2000.
43. Wilkinson JB y Moore RJ. Cosmetología de Harry. Madrid, Ediciones Díaz de Santos S.A, 1990.
44. Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant. Mass Spectrometry. Third Edition. England, John Wiley & Sons, Ltd, 2007:217-32.
45. Kitson FG, Larsen Bs, McEwen CN. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. San Diego, California. Academic Press, 1996:181-6.
46. Marvin C, McMaster. GC/MS: A Practical Users Guide. Second Edition. New Jersey. John Wiley & Sons. 2008: 113-18.
47. Ekman R *et al.* Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation and Applications. New Jersey. John Wiley & Sons, 2009:121-7.
48. Joyeux M, Mortier F, Fleurentin J. Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plant extracts used in Caribbean folk medicine. *Phytotherapy Research*; 1995; 9(3): 228-30.
49. Brand - Williams W, Cuvelier MF, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol* 1995; 20:25-30.
50. Howes E *et al.* The healing of wounds determined by their tensile strength. *J. Am. Med. Assoc.* 1929; 92: 42-5.
51. Vaisberg JA, Milla M, Córdova JL, Agusti ER, Ferreira R, Mustiga MC. Taspina is the cicatrizant principle in sangre de grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta médica*. 1989; 55: 140-3.
52. Arroyo J, Pareja B, Raez J. Efecto cicatrizante de *Piper angustifolium* R&P sobre lesiones de piel inducidas en animales de experimentación. *Folia dermatológica* 1999; 10(1): 48-51.
53. Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana. México. D.F. 1991.

54. Wayne WD. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª edición. Editorial Limusa S.A. México. D.F. 2002.
55. Hernández JE, Tenorio JI, Rojas CM, Vallejo GA. Evaluation of the leishmanicidal activity of the ethanolic extracts of *Rollinia rufinervis* on *Leishmania chagasi*, *Vitae*; 2005; 12(2): 37-43.
56. Bartlett MF, Dickel DF, Taylor WI. Los alcaloides de la *Tabernanthe iboga* parte IV. Las estructuras de ibogamine, ibogaine, *tabernanthine* y voacangine. *Journal of the American Chemical Society*. 1958; 80(1):126.
57. Kuehne, Martin E, Reider PJ. Una síntesis de ibogamine. *The Journal of Organic Chemistry*. 1985; 50(9):1464.
58. Levi MS, Borne Rf. Una revisión de los agentes químicos en el tratamiento farmacológico de la adicción. *Curr. Medicina hem.* 2002; 9(20): 1807-1818.
59. Alper KR, Lotsof HS, Kaplan CD. The ibogaine medical Subculture. *J. Ethnopharmacology*. 2008; 115(1):9-24.
60. Alper KR, Lotsof HS, Frenken GM, Luciano DJ, Bastiaans J. Treatment of Acute Opioid Withdrawal with Ibogaine. *The American Journal on Addictions*. 1999; 9(3):234-42.
61. Tsing, Hua Antiaddictive indole alkaloids in *Ervatania yunnanensis* and their bioactivity. *Academic Journal of Second Military Medical University*. January 28, 2006. (<http://www.shvoong.com/medicineand-health/1611478-antiaddictive-indole-alkaloids-ervatania-yunnanensis/>).
62. Mokry J, Kompis I. Vincaminoridine and Vincoridine, two new alkaloids from *Vinca minor* L. *Die naturwissenschaften*. 1963; 50(3):93-4.
63. Abdurakhimova N, Yuldashed PKh, Yunosov Syu. The structure of majdine, pseudokopsinini, and vinervinine. *Chemistry of Natural Compounds*. 1967; 3(5):263-6.
64. Habib-Ur-Rehman. Isolation and structural studies on the chemical constituents of *Rhazya stricta* and related medicinal plants. *J. Nat. Prod.* 1986; 49:1138.
65. Gutiérrez YD, Sangama MD, Rengifo SE, Gimenez TA. Evaluación de actividad antiplasmódica *in vitro* de extractos de *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia* y *Croton lechleri*. *Biofarbo: Órgano Oficial del Colegio de Bioquímica y Farmacia de Bolivia*. La Paz dic. 2008; (1): 16-20.

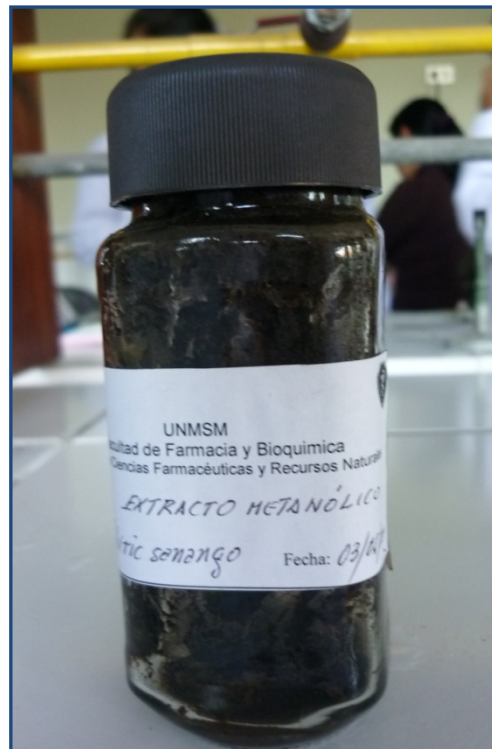
- 66.Bravo L. Polifenols. Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr. Rev. 1998; 56:317-33.
- 67.Hosegawa M. 2005. Compuestos Aromáticos. [visitado el 14 de julio 2011]. Disponible en www.udl.es/usuarios/v9337843/Publicaciones.

VIII. ANEXOS

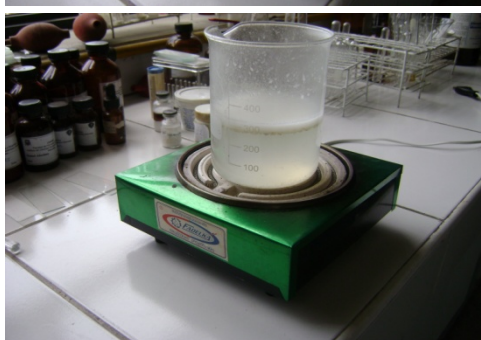
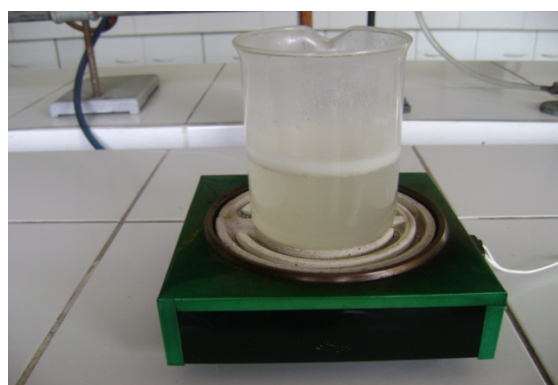
Anexo 1. Clasificación taxonómica *Brunfelsia grandiflora* D. Don

	<p>Universidad Nacional Mayor de San Marcos MUSEO DE HISTORIA NATURAL</p>	
<p>CONSTANCIA N° 065-DB-MHN</p>		
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal recibida (tallo, hojas, flores y frutos) del representante del Instituto de Investigación, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y determinada como <i>Brunfelsia grandiflora</i> D. Don. Y tiene la siguiente posición Sistemática de acuerdo a Cronquist (1988):</p>		
<p>DIVISION : MAGNOLIOPHYTA</p>		
<p>CLASE : MAGNOLIOPSIDA</p>		
<p>ORDEN : SCROPHULARIALES</p>		
<p>FAMILIA : SOLANACEAE</p>		
<p>GENERO : <i>Brunfelsia</i></p>		
<p>ESPECIE: <i>Brunfelsia grandiflora</i> D. Don</p>		
<p>Nombre vulgar : "Chiric sanango"</p>		
<p>Determinada por : Blgo. Severo Baldeón M.</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de los interesados, para los fines que estime convenientes.</p>		
<p>Lima, 01 de agosto de 2003</p>		
<p>AACE/ddb</p>		<p> Mg. Asunción Alipio Cano Echevarría JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>
<p>Av. Arenales 1256, Jesús María Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú</p>	<p>Telfs.: (511) 471-0117, 470-4471, 470-7918</p>	<p>Fax: (511) 265-681 e-mail: museohn@unmsm.edu.pe</p>

Anexo 2. Maceración y extracto metanólico



Anexo 3. Formulación del semisólido





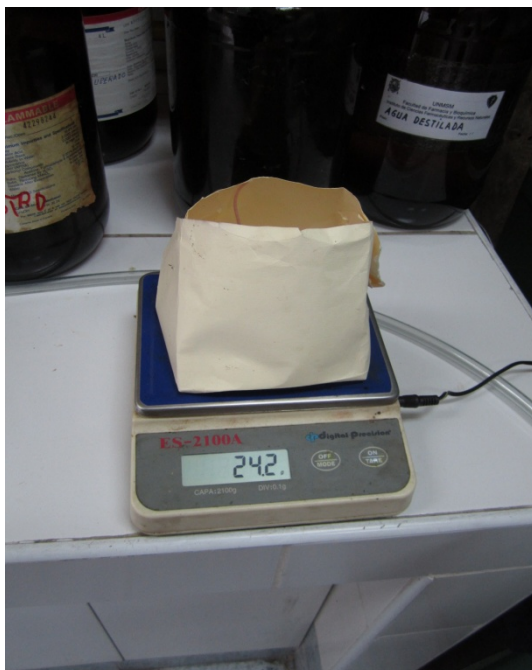
Anexo 4. Patrón cicatrizante ungüento comercial



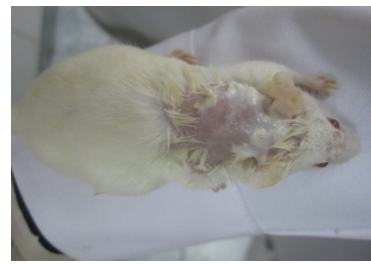
Anexo 5. Material biológico



Anexo 5.1. Pesada del material biológico.



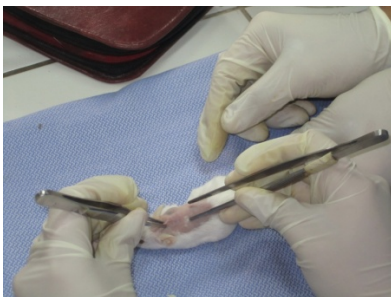
Anexo 6. Aplicación de la crema depilatoria



Anexo 7. Aplicación de la anestesia antes de la incisión



Anexo 8. Incisión y sutura

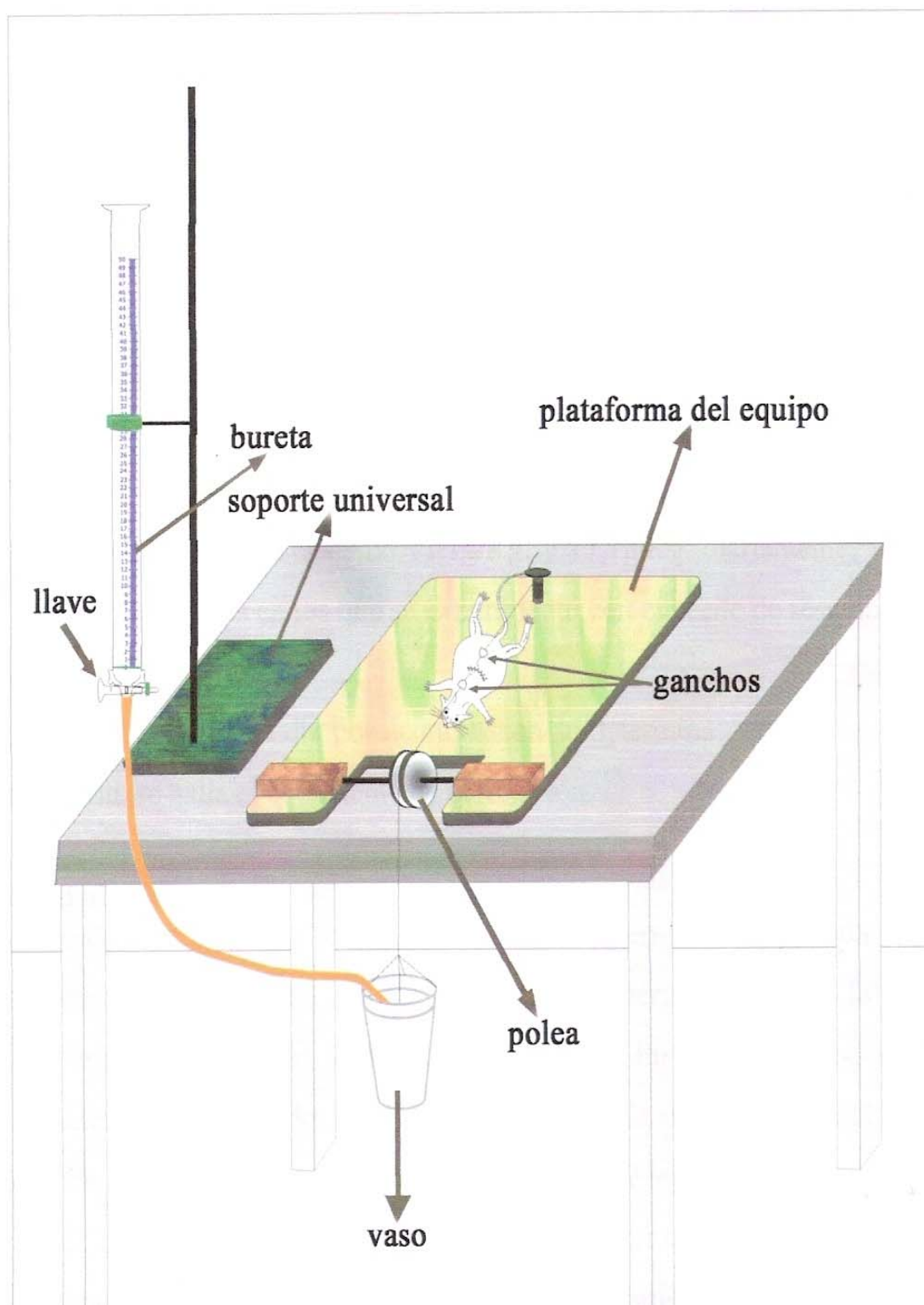


Anexo 9. Cicatrización y prueba de Howes et al, corte de piel



Anexo 10.

EQUIPO DE TENSIÓN DE HOWES Y COL



Anexo 11. Cromatógrafo de Gases/Espectrómetro de Masas (CG/EM) Modelo CG: Trace/EM: Trace.



Anexo 12. Espectrofotómetro Labomed Inc. UV-VIS Double Beam PC and scanning autocell.

